

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 074**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07	(2010.01)
A61L 27/00	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)
C12N 5/077	(2010.01)
A61K 35/22	(2015.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2014 PCT/JP2014/066081**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200115**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2014 E 14811223 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3020803**

54 Título: **Método para producir células precursoras renales**

30 Prioridad:

11.06.2013 JP 2013123072
25.04.2014 JP 2014092108

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2020

73 Titular/es:

KYOTO UNIVERSITY (50.0%)
36-1, Yoshida-honmachi Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP y
ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

OSAFUNE, KENJI;
TOYOHARA, TAKAFUMI y
YAMAGISHI, YUKIKO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 794 074 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir células precursoras renales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células progenitoras renales (o del riñón). La presente divulgación también se refiere a un fármaco terapéutico para nefropatías que comprenden las células progenitoras renales así obtenidas.

10

Antecedentes de la técnica

El riñón es un órgano importante que tiene funciones para mantener la salud física al eliminar, a través de la filtración, los productos de desecho, tales como sustancias nocivas o perjudiciales generadas como resultado de actividades metabólicas dentro de los organismos vivos, desde la sangre. Un ejemplo de nefropatías es la insuficiencia renal, y un ejemplo de métodos terapéuticos para ella es la diálisis. Sin embargo, la carga impuesta por los gastos médicos necesarios para dicha terapia es alta y, por lo tanto, la insuficiencia renal sigue siendo un problema mundial, no solo desde la perspectiva médica, sino también desde el aspecto económico médico. Otro ejemplo de terapias para la insuficiencia renal es el trasplante renal, aunque la escasez de órganos de donantes es un grave problema de preocupación.

15

20

Por otro lado, las células pluripotentes tales como las células madre embrionarias (células ES, por sus siglas en inglés) y las células madre pluripotentes inducidas (células iPS, por sus siglas en inglés), que se pueden obtener mediante la introducción de genes específicos de células no diferenciadas en células somáticas, se han documentado (Documentos de Patentes 1 y 2). Como método terapéutico para la insuficiencia renal, por lo tanto, se ha investigado la terapia que consiste en trasplantar células renales obtenidas mediante la inducción de la diferenciación de estas células madre pluripotentes. Además, también se está considerando el desarrollo de fármacos terapéuticos utilizando células renales homogéneas que provienen de estas células madre pluripotentes.

25

30

Los riñones de mamíferos se generan a través de las tres etapas de desarrollo renal de pronefros, mesonefros y metanefros. Entre estas etapas, se sabe que el metanefros se genera en la región posterior del mesodermo intermedio. En este contexto, se han estudiado métodos para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes de ratón en el mesodermo intermedio con fines de nefrogénesis (documento no de patente 1), y se confirmó OSR1 como un marcador característico del mesodermo intermedio. Además, mediante el estudio utilizando células iPS humanas ('células iPS humanas con OSR1-GFP reportero') en donde se introdujo un gen de proteína verde fluorescente (GFP) utilizando un vector de cromosoma artificial bacteriano (BAC) mediante recombinación homóloga con el alelo OSR1 endógeno, la inducción de la diferenciación de células madre pluripotentes humanas en el mesodermo intermedio se logró con éxito utilizando Activina A, Wnt, BMP y una variedad de compuestos de bajo peso molecular (documento no de patente 2 y documento de patente 3).

35

40

El documento de patente 4 se refiere a células de mesodermo tempranas, una población estable de células del mesodermo que tiene utilidad para la generación de linajes de endodermo y mesodermo y células migratorias multipotentes (mmc).

45

El documento de patente 5 se refiere a la inducción de células renales para el tratamiento de nefropatías

El documento de patente 6 se refiere a un método para cultivar células.

El documento de patente 7 se refiere a células progenitoras renales de células madre embrionarias.

50

El documento de patente 8 se refiere a un método para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes humanas en células del mesodermo intermedio.

El documento no de patente 5 se refiere a la base celular del desarrollo renal.

55

El documento no de patente 6 se refiere a la regeneración de riñón *in vitro* a partir de células madre pluripotentes.

El documento no de patente 7 se refiere a cómo la dorsomorfina inhibe las señales de BMP requeridas para la embriogénesis y el metabolismo del hierro.

60

El documento no de patente 8 se refiere a la ontogenia renal en el mono rhesus (*Macaca mulatta*) y la diferenciación dirigida de células madre embrionarias humanas hacia precursores renales.

65

El documento no de patente 9 se refiere a la inducción eficaz y rápida de iPSC/ESC humanos en el mesodermo intermedio nefrogénico usando métodos de diferenciación basados en moléculas pequeñas.

Considerando el trasplante en tejidos renales, es preferible inducir células progenitoras renales en una etapa más avanzada de diferenciación en un riñón que en la etapa del mesodermo intermedio. SIX2 se conoce como un factor que caracteriza a las células progenitoras renales (documento no de patente 4). Sin embargo, no existe un método establecido para inducir artificialmente células progenitoras renales a partir del mesodermo intermedio.

5

Documento de la técnica anterior

Documentos de patente

- 10 Documento de patente 1: Patente de EE.UU. N.º 5.843.780
 Documento de patente 2: WO2007/069666
 Documento de patente 3: WO2012/011610
 Documento de patente 4: WO 2008/094597
 Documento de patente 5: US 2010/111908
 15 Documento de patente 6: WO 2004/106499
 Documento de patente 7: US 2007/031966
 Documento de patente 8: WO 2013/094771

Documentos no de patente

- 20 Documento no de patente 1: Mae S, et al. (2010), Biochem Biophys Res Commun. 393: 877-82
 Documento no de patente 2: Mae S, et al. (2013), Nat Commun. 4: 1367
 Documento no de patente 3: Osafune K, et al. (2006), Development. 133: 151-61
 Documento no de patente 4: Kobayashi A, et al. (2008), Cell Stem Cell. 3: 169-81
 25 Documento no de patente 5: Dressler G., et al. (2006), Annual Review of Cell and Developmental Biology. 22: 509-529
 Documento no de patente 6: Osafune et al. (2010), Experimental Cell Research, Elsevier, Ámsterdam, NL. 316: 2571-2577
 Documento no de patente 7: Yu Paul B, et al. (2008), Nature Chemical Biology, Nature Publishing Group, Reino Unido. 4: 33-41
 30 Documento no de patente 8: Batchelder C A, et al. (2009), Differentiation, Springer Verlag, DE. 78: 45-56
 Documento no de patente 9: Arakoa T, et al. (2014), Plos One, 9: 1-14

Sumario de la invención

35

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para inducir la diferenciación de células del mesodermo intermedio en células progenitoras renales, más específicamente para proporcionar un método para inducir la diferenciación de células del mesodermo intermedio en células progenitoras renales que comprende una etapa de inducir células del mesodermo intermedio, que se inducen por células madre pluripotentes, en células progenitoras renales.

40

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios concentrados para lograr el objeto mencionado anteriormente. Como resultado, ahora han descubierto, por primera vez, que es posible inducir la diferenciación de células del mesodermo intermedio en células progenitoras renales cultivando las células del mesodermo intermedio en un medio que contiene activador de señalización de TGF β e inhibidor de BMP. La presente invención se ha completado basándose en dicho descubrimiento.

45

De manera específica, la presente invención abarca las siguientes características.

50

[1] Un método para producir células progenitoras renales a partir de células del mesodermo intermedio, que comprende la siguiente etapa de: cultivar células del mesodermo intermedio en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP, induciendo así células progenitoras renales a partir de células del mesodermo intermedio.

55

[2] El método de [1], en donde las células progenitoras renales son células SIX2-positivas.

[3] El método de [1] o [2], en donde las células del mesodermo intermedio son células OSR1-positivas.

[4] El método de una cualquiera de [1] a [3], en donde el activador de señalización de TGF β es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, IDE1 e IDE2.

[5] El método de una cualquiera de [1] a [4], en donde el inhibidor de BMP es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en dorsomorfina, noggin, LDN193189 e DMH1.

60

[6] El método de una cualquiera de [1] a [3], en donde el activador de señalización de TGF β es TGF β 1, y el inhibidor de BMP es DMH1.

[7] El método de una cualquiera de [1] a [6], en donde las células del mesodermo intermedio son células del mesodermo intermedio inducidas a partir de células madre pluripotentes.

65

[8] El método de [7], en donde las células del mesodermo intermedio son células del mesodermo intermedio producidas por un método que comprende las siguientes etapas de:

(i) cultivar células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico; y

5 (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.

[9] El método de [8], en donde la etapa (ii) comprende las siguientes etapas de:

10 (ii-1) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; y

15 (ii-2) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii-1) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.

[10] El método de [9], en donde la etapa (ii-1) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , y la etapa (ii-2) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.

20 [11] El método de una cualquiera de [8] a [10], en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[12] El método de una cualquiera de [8] a [11], en donde el derivado de ácido retinoico es AM580 o TTNPB.

[13] El método de una cualquiera de [7] a [12], en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS).

[14] El método de [13], en donde las células iPS son células iPS humanas.

25 [15] Un método para producir células progenitoras renales a partir de células madre pluripotentes, que comprende las siguientes etapas de:

(i) cultivar células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico;

30 (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico; y

35 (iii) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii) en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP.

[16] El método de [15], en donde las células progenitoras renales son células SIX2-positivas.

[17] El método de [15] o [16], en donde las células obtenidas en la etapa (ii) son células OSR1-positivas.

[18] El método de una cualquiera de [15] a [17], en donde el activador de señalización de TGF β es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, IDE1 e IDE2.

40 [19] El método de una cualquiera de [15] a [18], en donde el inhibidor de BMP es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en dorsomorfina, noggin, LDN193189 e DMH1.

[20] El método de una cualquiera de [15] a [17], en donde el activador de señalización de TGF β es TGF β 1, y el inhibidor de BMP es DMH1.

[21] El método de una cualquiera de [15] a [20], en donde la etapa (ii) incluye las siguientes etapas de:

45 (ii-1) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; y

50 (ii-2) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii-1) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de uno o más activadores de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.

[22] El método de [21], en donde la etapa (ii-1) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , y la etapa (ii-2) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.

55 [23] El método de una cualquiera de [15] a [22], en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.

[24] El método de una cualquiera de [15] a [23], en donde el derivado de ácido retinoico es AM580 o TTNPB.

[25] El método de una cualquiera de [15] a [24], en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS).

[26] El método de [25], en donde las células iPS son células iPS humanas.

60 De acuerdo con la presente invención, se hizo posible por primera vez inducir artificialmente células progenitoras renales a partir de células del mesodermo intermedio. Además, de acuerdo con la presente invención, se hizo posible por primera vez inducir artificialmente células progenitoras renales a partir de células madre pluripotentes (por ejemplo, células iPS). Además, se ha confirmado que las células progenitoras renales producidas por el método de la presente divulgación son eficaces para el tratamiento en modelos animales con nefropatías. Las células progenitoras renales producidas por el método de la presente divulgación se pueden usar en el tratamiento o la medicina regenerativa para

nefropatías que incluyen insuficiencia renal.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1, que incluye las Fig. 1A a 1D, muestra el contenido de células SIX2-positivas inducidas por diferenciación en los Ejemplos 2 a 4. La Fig. 1A muestra los resultados del cultivo en un medio que contiene DMSO como control. La Fig. 1B muestra los resultados de la inducción de diferenciación a través del método de inducción 1 (Ejemplo 2). La Fig. 1C muestra los resultados de la inducción de diferenciación a través del método de inducción 2 (Ejemplo 3). La Fig. 1D muestra los resultados de la inducción de diferenciación a través del método de inducción 3 (Ejemplo 4). En cada figura, tdTomato representa un gen reportero.

10 La Fig. 2, que incluye las Fig. 2A a 2H, muestra el contenido de células SIX2-positivas inducidas por diferenciación en el Ejemplo 5. La Fig. 2A muestra los resultados del cultivo en un medio que contiene DMSO como control. Las Fig. 2B, 2C y 2D muestran los resultados obtenidos con noggin, LDN193189 y DMH1, respectivamente, en sustitución de dorsomorfina, en la etapa 3 del método de inducción 1. Las Fig. 2E y 2F muestran los resultados obtenidos usando IDE1 e IDE2, respectivamente, en sustitución de TGFβ1, en la etapa 3 del método de inducción 1. La Fig. 2G muestra los resultados obtenidos usando TGFβ2 y LDN193189 en la etapa 3 del método de inducción 1. La Fig. 2H muestra los resultados obtenidos usando TGFβ3 y LDN193189 en la etapa 3 del método de inducción 1.

15 La Fig. 3, que incluye las Fig. 3A y 3B, muestra un ejemplo del método para producir células progenitoras renales OSR1+SIX2+ a partir de células iPS humanas. La Fig. 3A muestra un método para la diferenciación en células progenitoras renales OSR1+SIX2+ usando cultivo tridimensional de EB (cuerpos embrioides, por sus siglas en inglés). La Fig. 3B muestra los resultados del análisis del patrón de diferenciación en el transcurso del tiempo de las células OSR1+SIX2+ medidas por citometría de flujo, y específicamente, los resultados de la distribución de la población celular bidimensional (n = 5). La Fig. 3C muestra los resultados del análisis de la expresión de ARNm en el transcurso del tiempo para cada uno de los genes indicados en poblaciones celulares diferenciadas. Cada gráfico muestra los niveles de expresión del gen en relación con los niveles de expresión de β actina desde el día 1 hasta el día 28 (n = 3). La Fig. 3D muestra los resultados del análisis del patrón de diferenciación en el transcurso del tiempo de células OSR1+SEIS2+ medidas por citometría de flujo en el Ejemplo 7, y más específicamente, los resultados del análisis en el transcurso del tiempo de las poblaciones celulares (n = 5). En la Fig. 3D, d1 representa los resultados para las células iPS en el día 1, y d3 representa los resultados para EB (día 3) producido en un medio (etapa 1) que contiene CHIR99021 y activina A. En la Fig. 3D, d6 a d28 representan los resultados para el grupo DMSO (denominado "DMSO") y el grupo de tratamiento TGFβ1+TTNPB (denominado "Tx") del día 6 al día 28, respectivamente. Las células se cultivaron en un medio que contenía CHIR99021 y BMP7 en la etapa 2 durante 3 días (del día 3 al día 6), y luego se dividieron en un grupo de DMSO y en un grupo de Tx el día 6, seguido del cultivo en las etapas 3 y 4. Para el grupo de DMSO, las células se cultivaron en un medio que contenía DMSO en sustitución de TGFβ1 y TTNPB en la etapa 3 (donde el medio se intercambió con el mismo medio el día 8), y luego se cultivaron en un medio que contenía DMSO en sustitución de TGFβ1 y DMH1 en la etapa 4 (donde el medio se intercambió con el mismo medio cada 3 días). La Fig. 3E muestra la expresión de marcadores de células progenitoras renales en células progenitoras renales OSR1+SIX2+ diferenciadas de 4A6C3-10 en el día 28 de cultivo.

20 La Fig. 4 muestra los efectos de cada combinación de activadores de señalización de TGFβ e inhibidores de BMP sobre la inducción de células OSR1+SIX2+ a partir de células iPS humanas. Los datos se expresan como la media ± la EEM (n = 5).

25 La Fig. 5, que incluye las Fig. 5A y 5B, muestra los resultados de la inducción de diferenciación por el método de inducción 4 usando diferentes células iPS humanas y células ES humanas (es decir, niveles de expresión de OSR1 (Fig. 5A) y niveles de expresión de SIX2 (Fig. 5B)). Los resultados son los niveles de expresión de OSR1 y SIX2 en cada célula en relación con los niveles de expresión en 4A6C3-10.

30 La Fig. 6, que incluye las Fig. 6A a 6F, muestra los resultados de la prueba de evaluación de las células progenitoras renales. La Fig. 6A muestra imágenes de inmunotinción de células OSR1+SIX2+ después de cultivarlas en medio REGM durante 7 días. En esta figura, La NEPHRIN representa un marcador de podocitos glomerulares, AQP1 y MEGALIN representan marcadores de túbulos proximales, y UROMUCOID representa un marcador del asa de Henle. Estos marcadores se tiñeron de rosa y los núcleos se tiñeron de azul. La barra de escala es de 50 μm. La Fig. 6B muestra la imagen microscópica (el panel izquierdo) y las imágenes de inmunotinción (los 3 paneles restantes) después de 7 días de cocultivo de masa de células OSR1+SIX2+ y NIH3T3 que expresa Wnt4. La Fig. 6C muestra la imagen microscópica (el panel izquierdo) y las imágenes de inmunotinción (los 3 paneles restantes) después de 7 días de cocultivo de la masa de células OSR1+SIX2+ y la médula espinal embrionaria de ratón E11.5. La Fig. 6D muestra las imágenes de inmunotinción después del cultivo de órganos de la masa de células OSR1+SIX2+ y las células metanéfricas embrionarias de ratón E11.5. La Fig. 6E muestra la imagen de inmunotinción después del trasplante de masa de células OSR1+SIX2+ en almohadillas de grasa epididimaria de NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J. En esta figura, WT1 y PODOCALYXIN (PODX) representan marcadores de podocitos glomerulares (rojo y rosa, respectivamente), LTL representa un marcador de túbulo proximal (rojo), LAMININ representa un marcador de epitelio polarizado (rosa), CDH1 representa un marcador de túbulo distal (rosa), CDH6 representa un marcador de vesícula renal (rosa), y HuNu representa núcleo humano (verde), mientras que el núcleo del ratón se tiñe de azul y la barra de escala es de 50 μm. La Fig. 6F muestra las imágenes microscópicas (los paneles izquierdos) después del cultivo de órganos de 7 días de cada masa de células de las fracciones derivadas de células iPS (OSR1-SIX2-, OSR1+SIX2-, OSR1-SIX2+ y OSR1+SIX2+) y una yema ureteral de ratón

35
40
45
50
55
60
65

E11.5, y la imagen de inmunotinción (el panel derecho) después del cocultivo de masa de células OSR1+SIX2+ y yema ureteral. En esta figura, DBA representa un marcador de yema ureteral (rojo), y la barra de escala es de 50 μ m. HuNu representa el núcleo humano (verde), mientras que el núcleo del ratón se tiñe de azul.

La Fig. 7, que incluye las Fig. 7A a 7D, muestra los resultados de experimentos para trasplante en modelos de ratones con nefropatía. Las Fig. 7A y 7B muestran las imágenes de inmunotinción de secciones de riñón de modelos de ratón con lesión renal aguda (LRA) (Fig. 7A) y modelos de ratón con insuficiencia renal crónica (Fig. 7B), cuyos modelos son dos semanas después del trasplante de masa de células OSR1+SIX2+ en el parénquima renal. LTL y AQP1 representan marcadores de túbulo proximales, que están teñidos de verde y rojo, respectivamente. HuNu representa el núcleo humano (rosa). La barra de escala es de 50 μ m. La Fig. 7C muestra los resultados de los análisis de los niveles de NUS y los niveles de Cr en suero en el transcurso temporal para modelos de ratón de LRA sometidos a trasplante de subcápsula renal de hiPSC-RP (n = 10, iPSC-RP, triángulo), células iPS humanas no diferenciadas (n = 10, iPSC, cuadrado) o solución salina fisiológica (n = 10, solución salina, círculo) [* P < 0,05, **P < 0,01, *** P < 0,001 frente a solución salina]. La Fig. 7D muestra los hallazgos histológicos para tejidos renales que provienen de ratones que fueron sometidos a trasplante de hiPSC-RP (iPSC-RP) o solución salina fisiológica (solución salina). Los tejidos renales se tiñeron con ácido periódico de Schiff (PAS, paneles superiores) o tricromo de Masson (MT, paneles inferiores) el día 3 después de la isquemia-reperusión (I/R). La Fig. 7E muestra los resultados de la determinación del área de túbulo dilatado con yesos o fibrosis en los riñones del hospedador en el día 3 después de I/R [** P < 0,01 frente a la solución salina, n = 3 por grupo].

20 Modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá en detalle a continuación.

La presente invención proporciona un método para producir células progenitoras renales, que comprende una etapa de cultivo de células del mesodermo intermedio en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP.

La expresión "células del mesodermo intermedio" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier célula a partir de la cual se inducen células progenitoras renales, cuando se cultiva en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP de acuerdo con la invención. Los ejemplos de métodos conocidos para obtener células del mesodermo intermedio incluyen métodos para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes humanas y de ratón en células del mesodermo intermedio (documentos no de patente 1 y 2, y documento de patente 3). OSR1 se conoce como un marcador que caracteriza las células del mesodermo intermedio, y los ejemplos de las células del mesodermo intermedio usadas en el método de la invención incluyen células del mesodermo intermedio que son OSR1-positivas. Por ejemplo, es posible cultivar células madre pluripotentes (por ejemplo, células iPS humanas con reportero OSR1-GFP descritas en los ejemplos a continuación) que tienen un gen reportero (por ejemplo, GFP) introducido bajo el control de un promotor OSR1 y luego aislar células del mesodermo intermedio que son OSR1-positivas usando, como indicador, la expresión del gen reportero por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, métodos que usan el clasificador celular). También es posible confirmar la expresión de OSR1 en células del mesodermo intermedio utilizando métodos para analizar la expresión génica, tales como RT-PCR cuantitativa (Nat Commun 4, 1367, (2013)). En la presente invención, Las células del mesodermo intermedio que son OSR1-positivas incluyen células que expresan una proteína OSR1 y células que expresan una proteína codificada por un gen bajo el control del promotor OSR1. En la presente invención, los ejemplos de OSR1 incluyen genes que tienen las secuencias de nucleótidos con los números de registro NCBI NM_145260.2 (humano) y NM_011859.3 (ratón), proteínas codificadas por los genes y variantes naturales que tienen funciones de dichos genes. Preferentemente, las células del mesodermo intermedio utilizadas en el método de la invención son células SIX2-negativas y OSR1-positivas.

En la presente invención, las células progenitoras renales son células que pueden manejarse como células equivalentes a las células progenitoras de nefronas y se pueden diferenciar *in vitro* en estructuras del órgano, tales como la estructura de tipo glomerular y la estructura de tipo tubular, del riñón. La capacidad para diferenciarse en una estructura de órgano se puede evaluar mediante, por ejemplo, el método desvelado en Osafune K, et al. (2006), Development 133: 151-61. Un factor característico conocido para mantener el estado de las células progenitoras de nefronas es SIX2 (documento no de patente 4). Los ejemplos de células progenitoras renales inducidas por el método de la invención incluyen células progenitoras renales SIX2-positivas. Por ejemplo, es posible cultivar células madre pluripotentes (por ejemplo, células iPS humanas con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato tal como se describe en los ejemplos a continuación) que tienen un gen reportero (por ejemplo, tdTomato) introducido bajo el control de un promotor SIX2 y luego aislar células progenitoras renales SIX2-positivas usando, como indicador, la expresión del gen reportero por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, métodos que usan el clasificador celular). También es posible confirmar la expresión de SIX2 en células progenitoras renales mediante métodos para analizar la expresión génica, tales como la RT-PCR cuantitativa (Nat Commun 4, 1367, (2013)). En la presente invención, las células progenitoras renales SIX2-positivas incluyen células que expresan proteína SIX2 y células que expresan una proteína codificada por un gen bajo el control del promotor SIX2. En la presente invención, los ejemplos de SIX2 incluyen genes que tienen las secuencias de nucleótidos con los números de registro NCBI NM_016932.4 (humano) y NM_011380.2 (ratón), proteínas codificadas por los genes y variantes naturales que tienen funciones de dichos genes. Preferentemente, Las células progenitoras renales inducidas por el método de la invención son células OSR1-positivas

y SIX2-positivas.

En la presente invención, las células del mesodermo intermedio o las células progenitoras renales se pueden proporcionar en la forma de una población celular que comprende otros tipos de células o una población celular purificada, y en este caso, preferentemente, las células del mesodermo intermedio o las células progenitoras renales están contenidas en una cantidad del 5 % o más, 6 % o más, 7 % o más, 8 % o más, 9 % o más y el 10 %, 20 %, 28 % o 30 % o más en la población celular.

En el método de la invención, el mesodermo intermedio se puede cultivar mediante cultivo en suspensión o mediante cultivo de adhesión usando placas de cultivo recubiertas en el estado de células individuales que están sustancialmente disociadas (o separadas) usando cualquier método o en el estado de masa de células en el que las células están unidas entre sí. En el presente documento, los métodos para disociar células del mesodermo intermedio implican, por ejemplo, métodos de disociación mecánica y métodos de disociación que usan una solución de disociación que tiene actividad proteasa y actividad colagenasa (por ejemplo, una solución que contiene tripsina y colagenasa, tales como Accutase (TM) o Accumax (TM) (Innovative Cell Technologies, Inc.)) o una solución de disociación que tiene actividad de colagenasa sola.

El cultivo en suspensión utilizado en el método de la presente invención significa cultivar células de una manera no adherente en una placa de cultivo. Los ejemplos de la placa de cultivo que se puede usar incluyen, pero sin limitación, una placa de cultivo sin tratamiento artificial (por ejemplo, recubrimiento con una matriz extracelular o similar) para mejorar la adhesión a las células, y una placa de cultivo tratada artificialmente para evitar la adhesión (por ejemplo, recubrimiento con poli(metacrilato de hidroxietilo) (poli-HEMA)).

El cultivo de adhesión utilizado en el método de la presente invención significa cultivar células en una placa de cultivo recubierta. Los ejemplos de agentes de recubrimiento incluyen Matrigel (BD Biosciences), Synthemax (Corning), colágeno, gelatina, laminina, proteoglicano de heparán sulfato, entactina y sus combinaciones. Preferentemente, los agentes de recubrimiento son Matrigel, Synthemax, o gelatina.

Un medio usado en la etapa de cultivo de células del mesodermo intermedio en la invención se puede preparar añadiendo un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP a un medio basal para el cultivo de células animales. Los ejemplos del medio basal incluyen IMDM, Medio 199, Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), α MEM, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), F12 de Ham (F12), RPMI 1640, Medio de Fischer y sus mezclas. El medio puede contener suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS)) o puede estar libre de suero. Cuando sea necesario, el medio puede contener uno o más reemplazos de suero, tales como albúmina, transferrina, reemplazo de suero de inactivación (KSR, del inglés *KnockOut Serum Replacement*) (un reemplazo de suero para el cultivo de células ES) (Invitrogen), suplemento de N2 (Invitrogen), suplemento de B27 (Invitrogen), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol y 3'-tioglicerol, y además puede contener una o más sustancias, tales como lípidos, aminoácidos, L-glutamina, GlutaMAX (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (AANE), vitaminas, factor de crecimiento, antibiótico, antioxidante, ácido pirúvico, agentes tamponantes, sales inorgánicas, y sus equivalentes. En una realización, el medio basal es una mezcla que contiene DMEM y F12 a 1:1 (DMEM/F12) suplementado con GlutaMAX, KSR, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol y antibiótico.

El activador de señalización de TGF β utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que active la vía de señalización de TGF β . Los ejemplos del activador de señalización de TGF β incluyen proteínas, tales como TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 (disponible de Peprotech, R&D, etc.), y compuestos, tales como IDE1 (ácido (Z)-2-((2-(6-carboxihexanoil)hidrazono)metil)benzoico) e IDE2 (ácido 7-(2-ciclopentilidenohidrazinil)-7-oxoheptanoico) (Borowiak M, et al, Cell Stem Cell. 2009, 4: 348-58). IDE1 e IDE2 están disponibles en Stemgent, Tocris, etc. El activador de señalización de TGF β preferible es TGF β 1.

En la presente invención, la concentración de un activador de señalización de TGF β se puede determinar de manera apropiada por un experto en la técnica dependiendo de los activadores de señalización de TGF β que se vayan a utilizar. Cuando una proteína, tal como TGF β 1, TGF β 2 o TGF β 3, se utiliza como activador de señalización de TGF β , su concentración es, por ejemplo, de 0,1 ng/ml a 100 ng/ml, preferentemente de 1 ng/ml a 10 ng/ml, más preferentemente, de 5 ng/ml a 10 ng/ml. Además, cuando IDE1 o IDE2 se usan como activador de señalización de TGF β , su concentración es de 1 μ M a 100 μ M, preferentemente de 25 μ M a 75 μ M, más preferentemente de 40 μ M a 60 μ M.

El inhibidor de BMP usado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que inhiba la vía de señalización de BMP (proteína morfogenética ósea). Los ejemplos del inhibidor de BMP incluyen: proteínas inhibitoras tales como la cordina, noggin y folistatina; dorsomorfina (6-[4-(2-piperidin-1-il-etoxi)fenil]-3-piridin-4-il-pirazolo[1,5-a]pirimidina) y sus derivados (P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116: II_60; P.B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4: 33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3 (8): e2904); DMH1 (4-[6-(4-isopropoxifenil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]quinolona, 4-[6-[4-(1-metiletoxi)fenil]pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il]-quinolina); y LDN193189 (4-(6-(4-(piperazin-1-il)fenil)pirazolo[1,5-a] pirimidin-3-il)quinolina). La dorsomorfina y LDN193189 están disponibles comercialmente de Sigma-Aldrich, Stemgent, Merck, Axon Medchem, Peprotech, etc. Preferentemente, el inhibidor de BMP es DMH1, noggin, LDN193189 o dorsomorfina, más preferentemente, DMH1.

En la presente invención, la concentración de un inhibidor de BMP usada se puede determinar de manera apropiada por un experto en la técnica dependiendo de los inhibidores de BMP que se vayan a utilizar. Cuando una proteína inhibidora, tal como cordina, noggin o folistatina, se usa como inhibidor de BMP, su concentración es, por ejemplo, de 0,1 ng/ml a 1000 ng/ml, preferentemente de 1 ng/ml a 500 ng/ml, más preferentemente, de 10 ng/ml a 100 ng/ml. Además, cuando la dorsomorfina, el DMH1 o LDN193189 se usan como inhibidores de BMP, su concentración es de 0,01 μ M a 100 μ M, preferentemente de 0,1 μ M a 10 μ M, más preferentemente de 0,5 μ M a 1 μ M.

En el paso de cultivar células del mesodermo intermedio en la invención, cualquiera de o cualquier combinación de FGF9, FGF20, BMP7, un derivado de ácido retinoico y un inhibidor de GSK-3 β se pueden añadir a un medio basal.

En la presente invención, no hay límite superior de días de cultivo en la etapa de cultivar células del mesodermo intermedio, porque el cultivo a largo plazo no afecta particularmente a la eficacia de producción de las células progenitoras renales. Los días de cultivo son, por ejemplo, 2 días o más, 4 días o más, 6 días o más, 8 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más, 16 días o más, 17 días o más, 18 días o más, 19 días o más, o 20 días o más.

En la etapa de cultivar células del mesodermo intermedio, la temperatura de cultivo es, pero sin limitación, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C y preferentemente, de aproximadamente 37 °C. El cultivo se lleva a cabo en una atmósfera de aire que contiene CO₂. La concentración de CO₂ es preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %.

En una realización de la presente invención, las células del mesodermo intermedio son células del mesodermo intermedio inducidas por células madre pluripotentes. En este caso, las células del mesodermo intermedio inducidas se pueden aislar, seguido de la inducción de células progenitoras renales de las células del mesodermo intermedio aisladas en la etapa de cultivo de la presente invención. Como alternativa, las células del mesodermo intermedio se pueden inducir a partir de células madre pluripotentes, seguido de someter directamente a las células del mesodermo intermedio, sin aislarlas, a la etapa de cultivo de la presente invención para inducir células progenitoras renales.

Cuando las células del mesodermo intermedio están aisladas, se pueden usar células madre pluripotentes que tienen un gen reportero que se expresa bajo el control de un promotor OSR1 endógeno. Un ejemplo de un método para introducir un gen reportero bajo el control de un promotor OSR1 en células madre pluripotentes es la recombinación homóloga usando un vector BAC o similar, que se desvela en, por ejemplo, el documento WO2012/011610. Además, para aislar las células progenitoras renales inducidas, se pueden usar células madre pluripotentes que tienen un gen reportero que se expresa bajo el control de un promotor SIX2. Dichas células madre pluripotentes se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente. Los ejemplos del gen reportero que se va a utilizar incluyen genes que codifican proteínas reporteras conocidas, tales como β -galactosidasa, β -glucosidasa, luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), tdTomato y proteínas de la superficie celular. Las células del mesodermo intermedio o las células progenitoras renales, que se inducen a partir de las células madre pluripotentes anteriores, se pueden aislar por métodos conocidos en la técnica, tales como un método que utiliza un clasificador de células que utiliza la expresión de la proteína reportera como indicador, un método para clasificar las células usando un anticuerpo contra la proteína de la superficie celular a través de las propiedades magnéticas de las perlas magnéticas (por ejemplo, MACS), y un método que usa un vehículo en el que el anticuerpo o similar se inmoviliza (por ejemplo, una columna de enriquecimiento celular).

El término "células madre pluripotentes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a células madre que tienen pluripotencia capaces de diferenciarse en varios tipos de células presentes en cuerpos vivos, así como una capacidad de proliferación, incluyendo cualquier célula madre pluripotente a partir de la cual se inducen células del mesodermo intermedio utilizables en la invención. Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen, pero sin limitarse particularmente a, células madre embrionarias (ES), células madre embrionarias de transferencia nuclear (ntES) que provienen de embriones clonados, células madre de la línea germinal ("células GS"), células germinales embrionarias ("células EG"), células madre pluripotentes inducidas (iPS), y células pluripotentes cultivadas derivadas de fibroblastos o de células madre de médula ósea (células Muse). Preferentemente, las células madre pluripotentes son células iPS, desde el punto de vista de que las células iPS se pueden obtener sin destruir embriones, óvulos (o huevos), o similares, en la producción. Más preferentemente, las células madre pluripotentes son células iPS humanas.

Los métodos para producir células iPS se conocen en la técnica y, por lo tanto, las células iPS se pueden producir mediante la introducción de factores de reprogramación en cualquiera de las células somáticas. En el presente documento, los ejemplos de los factores de reprogramación incluyen los siguientes genes o productos génicos: Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tel1, beta-catenina, Lin28b, Sall1, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3 e Glis1. Estos factores de reprogramación se pueden usar solos o en combinación. En los siguientes documentos se describen ejemplos de una combinación de factores de reprogramación: WO2007/069666, WO2008/118820, WO2009/007852, WO2009/032194, WO2009/058413; WO2009/057831; WO2009/075119; WO2009/079007; WO2009/091659; WO2009/101084; WO2009/101407; WO2009/102983; WO2009/114949; WO2009/117439; WO2009/126250; WO2009/126251; WO2009/126655; WO2009/157593; WO2010/009015; WO2010/033906; WO2010/033920; WO2010/042800; WO2010/050626;

WO2010/056831; WO2010/068955; WO2010/098419; WO2010/102267; WO 2010/111409; WO2010/111422; WO2010/115050; WO2010/124290; WO2010/147395; WO2010/147612; Huangfu, D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797; Shi, Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528; Eminli, S, et al. (2008), Stem Cells. 26: 2467-2474; Huangfu, D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26: 1269-1275; Shi, Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574; Zhao, Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3: 475-479; Marson, A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135; Feng, B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11: 197-203; Judson, RL, et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27: 459-461; Lyssiotis, CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106: 8912-8917; Kim, JB, et al. (2009), Nature 461: 649-643; Ichida, JK, et al. (2009), Cell Stem Cell 5: 491-503; Heng, JC, et al. (2010), Cell Stem Cell 6: 167-74; Han, J, et al. (2010), Nature 463: 1096-100; Mali, P, et al. (2010), Stem Cells 28: 713-720; y Maekawa, M, et al. (2011), Nature 474: 225-9.

Los ejemplos de células somáticas incluyen, pero sin limitación, cualquiera de las células somáticas fetales, células somáticas neonatales y células somáticas sanas o afectadas maduras, que pueden ser células primarias cultivadas, células subcultivadas o células establecidas. De manera específica, los ejemplos de células somáticas incluyen: (1) células madre de tejido (o células madre somáticas) tales como células madre neurales, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y células madre de pulpa dental; (2) células progenitoras de tejido; y (3) células diferenciadas tales como hematocitos (por ejemplo, células de sangre periférica y células de sangre del cordón umbilical), linfocitos, células epiteliales, células endoteliales, células musculares, fibroblastos (por ejemplo, células de la piel), células ciliadas, hepatocitos, células de la mucosa gástrica, enterocitos, células del bazo, células pancreáticas (por ejemplo, células exocrinas pancreáticas), células cerebrales, células pulmonares, células renales y adipocitos.

Además, cuando las células iPS se usan como material para las células de trasplante, es preferible utilizar células somáticas que tengan un genotipo HLA que sea idéntico o sustancialmente idéntico al de un receptor para evitar el rechazo. La expresión "sustancialmente idéntica" utilizada en el presente documento significa la correspondencia de los genotipos de HLA hasta el punto de que la inmunorreacción de las células trasplantadas se puede suprimir usando un inmunosupresor. Por ejemplo, se pueden usar células somáticas que tienen el genotipo HLA que muestra que tres loci genéticos, es decir, HLA-A, HLA-B y HLA-DR, o cuatro loci genéticos que incluyen los tres loci genéticos y HLA-C mencionados anteriormente son idénticos a los de un receptor.

En la presente invención, se puede utilizar un método que comprende las siguientes etapas para inducir la diferenciación de células madre pluripotentes en células del mesodermo intermedio:

- (i) cultivar células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico; y
- (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.

Cada etapa se describe en más detalle a continuación.

- (i) Etapa de cultivo de células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico:

En esta etapa, las células madre pluripotentes se pueden disociar mediante un método conocido en la técnica y luego se pueden cultivar mediante cultivo en suspensión o cultivo de adhesión. Los ejemplos de un método para disociar células madre pluripotentes incluyen la disociación mecánica y la disociación con el uso de una solución de disociación que tiene actividad proteasa y actividad colagenasa (por ejemplo, Accutase (TM) o Accumax (TM) (Innovative Cell Technologies, Inc.)) o una solución de disociación que solo tiene actividad colagenasa. Preferentemente, el método para la disociación es un método que comprende la disociación de las células usando una solución de disociación que tiene actividad proteasa y actividad colagenasa y la dispersión de las células en células individuales de una manera mecánica y correcta. Preferentemente, las células madre pluripotentes humanas utilizadas en esta etapa son colonias cultivadas para convertirse en un 70 % al 80 % de confluencia en una placa a utilizar.

Se puede preparar un medio usado en la etapa (i) añadiendo una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico a un medio basal para cultivo de células animales. En una realización, las sustancias utilizadas en esta etapa son: una combinación de Activina A y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; o una combinación de un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico. Los ejemplos de un medio basal incluyen IMDM, Medio 199, Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), α MEM, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), F12 de Ham (F12), RPMI 1640, Medio de Fischer y sus mezclas. El medio puede contener suero (por ejemplo, FBS) o puede estar libre de suero. Si fuera necesario, el medio puede contener uno o más reemplazos de suero, tales como albúmina, transferrina, reemplazo de suero de inactivación (KSR) (que es un reemplazo de suero para el cultivo de células ES) (Invitrogen), suplemento de N2 (Invitrogen), suplemento de B27 (Invitrogen), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol y 3'-tioglicerol, y además puede contener una o más sustancias, tales como lípidos, aminoácidos, L-glutamina, GlutaMAX (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (AANE), vitaminas, factor

de crecimiento, compuestos de bajo peso molecular, antibiótico, antioxidante, ácido pirúvico, agente tamponador o sales inorgánicas. En una realización de esta etapa, el medio basal es DMEM/F12 que contiene GlutaMAX, suero y antibiótico.

5 En la etapa (i), los ejemplos de activina A incluyen activina A derivada de humanos u otros animales y variantes funcionales de la misma. Por ejemplo, se puede usar Activina A, que está disponible comercialmente de R&D Systems, etc. La concentración de Activina A utilizada en esta etapa es de 1 ng/ml a 1000 ng/ml, preferentemente de 10 ng/ml a 500 ng/ml, más preferentemente, de 50 ng/ml a 200 ng/ml.

10 En la etapa (i), el inhibidor de GSK-3 β no está particularmente limitado siempre que pueda inhibir una función de GSK-3 β tal como la actividad cinasa. Los ejemplos del inhibidor de GSK-3 β incluyen BIO (otro nombre, inhibidor de GSK-3 β IX; 6-bromoindirubin-3'-oxima), que es un derivado de indirubina, SB216763 (3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona) que es un derivado de maleimida, inhibidor de GSK-3 β VII (α ,4-dibromoacetofenona) que es un compuesto de fenil- α -bromometilcetona, L803-mts (otro nombre, inhibidor del péptido GSK-3 β ; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH₂: SEQ ID NO: 1) que es un péptido fosforilado que penetra en las células, y CHIR99021 (Nature (2008) 453: 519-523) que tiene alta selectividad. Estos compuestos están disponibles en, por ejemplo, Stemgent, Calbiochem y Biomol o, como alternativa, pueden estar preparados por uno mismo. El inhibidor de GSK-3 β preferible utilizado en esta etapa es CHIR99021. La concentración de un inhibidor de GSK-3 β usada en esta etapa se puede determinar de manera apropiada por una persona experta en la técnica dependiendo de los inhibidores de GSK-3 β que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa CHIR99021 como inhibidor de GSK-3 β , su concentración es de 0,01 μ M a 100 μ M, preferentemente de 0,1 μ M a 10 μ M, más preferentemente de 1 μ M a 3 μ M.

En la etapa (i), los derivados del ácido retinoico pueden ser ácidos retinoicos modificados artificialmente que mantienen la función del ácido retinoico natural, tal como compuestos retinoides o compuestos de vitamina D3. Los ejemplos de compuestos retinoides incluyen ácido retinoico, ácido 3-deshidrorretinoico, ácido 4-[[[(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)carbonil]amino]-benzoico (AM580) (Tamura, K. et al., Cell Differ. Dev. 32: 17-26 (1990)), ácido 4-[(1E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propen-1-il]-benzoico (TTNPB) (Strickland S, et al., Cancer Res. 43: 5268-5272 (1983)), compuestos descritos en Tanenaga, K. et al., Cancer Res. 40: 914-919 (1980), palmitato de retinol, retinol, 3-deshidrorretinol y 3-deshidrorretinal. Los ejemplos de compuestos de ácido retinoico incluyen un compuesto retinoide que tiene un grupo carboxilo, tal como el ácido retinoico, ácido 3-deshidrorretinoico, AM580 o TTNPB. Los ejemplos de compuestos de vitamina D3 incluyen compuestos descritos en Abe, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 78: 4990-4994 (1981) y compuestos descritos en Schwartz, E. L. et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 18 (1983). En una realización de esta etapa, un derivado de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto de vitamina D3. En otra realización de esta etapa, el derivado de ácido retinoico es un compuesto retinoide. También en otra realización, el derivado de ácido retinoico es un compuesto de ácido retinoico. Los ejemplos de un derivado de ácido retinoico preferible utilizado en esta etapa incluyen AM580 o TTNPB. La concentración del derivado de ácido retinoico usada en esta etapa se puede determinar apropiadamente por una persona experta en la técnica dependiendo de los derivados de ácido retinoico que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa AM580 o TTNPB como derivado del ácido retinoico, su concentración es de 0,01 μ M a 100 μ M, preferentemente de 0,1 μ M a 10 μ M, más preferentemente de 0,5 μ M a 2 μ M.

El medio utilizado en la etapa (i) puede contener además un inhibidor de ROCK. En particular, cuando esta etapa incluye una etapa de dispersión de células madre pluripotentes en células individuales, es preferible que contenga un inhibidor de ROCK en el medio.

45 El inhibidor de ROCK no está particularmente limitado siempre que pueda inhibir la función de la Rho-cinasa (ROCK), y sus ejemplos incluyen: Y-27632 (véase, por ejemplo, Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000); Narumiya et al., Methods Enzymol. 325,273-284 (2000)), Fasudil/HA1077 (véase, por ejemplo, Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)), H-1152 (véase, por ejemplo, Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)), Wf-536 (véase, por ejemplo, Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)), y sus derivados; y ácidos nucleicos antisentido, ácidos nucleicos que inducen ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip), y mutantes negativos dominantes de ROCK, y vectores de expresión para ellos. Además, otros compuestos conocidos de bajo peso molecular también se pueden usar como inhibidores de ROCK (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2005/0209261, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2005/0192304, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2004/0014755, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2004/0002508, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2004/0002507, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2003/0125344, la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2003/0087919, WO2003/062227, WO2003/059913, WO2003/062225, WO2002/076976 y WO2004/039796). En la presente invención, se pueden usar uno o dos o más tipos de inhibidores de ROCK. Un ejemplo preferible del inhibidor de ROCK utilizado en esta etapa es Y-27632. La concentración de un inhibidor de ROCK usada en esta etapa se puede determinar de manera apropiada por una persona experta en la técnica dependiendo de los inhibidores de ROCK que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa Y-27632 como inhibidor de ROCK, su concentración es de 0,1 μ M a 100 μ M, preferentemente de 1 μ M a 50 μ M, más preferentemente de 5 μ M a 20 μ M.

65 La temperatura de cultivo en la etapa (i) puede ser, pero sin limitación, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C y preferentemente de aproximadamente 37 °C, y el cultivo se lleva a cabo en una atmósfera de aire que contiene

CO₂. La concentración de CO₂ es de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %, y preferentemente, de aproximadamente el 5 %. El período de cultivo en esta etapa es, por ejemplo, 2 días o menos y preferentemente 2 días. (ii) Etapa de cultivo de las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico:

En esta etapa, la población celular *per se* obtenida después del cultivo en suspensión en la etapa (i) anterior se puede someter a un cultivo de adhesión en una placa de cultivo recubierta que contenga cualquiera de los medios o, como alternativa, las células obtenidas por cultivo de adhesión en la etapa (i) pueden continuar para cultivarlas mientras se intercambia el medio.

Se puede preparar un medio utilizado en la etapa (ii) añadiendo una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico a un medio basal para cultivo de células animales. En una realización, las sustancias utilizadas en esta etapa son una combinación de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , o un derivado (o derivados) de ácido retinoico. Los ejemplos del medio basal incluyen IMDM, Medio 199, Medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), α MEM, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), F12 de Ham (F12), RPMI 1640, Medio de Fischer y sus mezclas. El medio puede contener suero (por ejemplo, FBS) o puede estar libre de suero. Si fuera necesario, el medio puede contener uno o más reemplazos de suero, tales como albúmina, transferrina, reemplazo de suero de inactivación (KSR) (que es un reemplazo de suero para el cultivo de células ES) (Invitrogen), suplemento de N2 (Invitrogen), suplemento de B27 (Invitrogen), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercaptoetanol o 3'-tioglicerol, o puede contener además una o más sustancias, tales como lípidos, aminoácidos, L-glutamina, GlutaMAX (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (AANE), vitaminas, factor de crecimiento, antibiótico, antioxidante, ácido pirúvico, agente tamponador, sales inorgánicas, o equivalentes de los mismos. En una realización de esta etapa, el medio basal es una mezcla que contiene DMEM y F12 a 1:1 (DMEM/F12) suplementado con GlutaMAX, KSR, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol y antibiótico.

En la etapa (ii), por ejemplo, las células obtenidas en la etapa (i) se pueden cultivar en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , luego en un medio que contiene un derivado (o derivados) de ácido retinoico. Preferentemente, en la etapa (ii), las células obtenidas en la etapa (i) se cultivan en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , luego en un medio que contiene un derivado (o derivados) de ácido retinoico y un activador (o activadores) de señalización de TGF β .

Por lo tanto, la etapa (ii) se puede separar en las siguientes etapas de:

- (ii-1) cultivar las células en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; y
- (ii-2) cultivar las células en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.

Más preferentemente, en la etapa (ii), la etapa (ii-1) es una etapa de cultivo de las células en un medio que contiene BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , y la etapa (ii-2) es una etapa de cultivo de las células en un medio que contiene un activador (o activadores) de la señalización de TGF β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.

En la etapa (ii), ejemplos de BMP7 incluyen BMP7 humano (N.º de registro del NCBI: NM_001719.2), otro BMP7 derivado de animales y variantes funcionales de los mismos. Por ejemplo, se puede usar BMP7 disponible comercialmente de Invitrogen, R&D, etc. La concentración de BMP7 utilizada en esta etapa es de 1 ng/ml a 1000 ng/ml, preferentemente de 10 ng/ml a 500 ng/ml, más preferentemente, de 50 ng/ml a 200 ng/ml.

En la etapa (ii), se pueden usar los inhibidores de GSK-3 β tal como se ejemplifica en la etapa (i) anterior. El inhibidor de GSK-3 β preferible es CHIR99021. La concentración de un inhibidor de GSK-3 β usada en esta etapa se puede determinar de manera apropiada por una persona experta en la técnica dependiendo de los inhibidores de GSK-3 β que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa CHIR99021 como inhibidor de GSK-3 β , su concentración es de 0,01 μ M a 100 μ M, preferentemente de 0,1 μ M a 10 μ M, más preferentemente de 1 μ M a 3 μ M.

En la etapa (ii), el activador de señalización de TGF β no está particularmente limitado siempre que active la vía de señalización de TGF β . Los ejemplos del activador de señalización de TGF β que se pueden usar incluyen: TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3; o IDE1 e IDE2. El activador de señalización de TGF β preferible es TGF β 1. En la etapa (ii), la concentración de un activador de señalización de TGF β que se va a utilizar se puede determinar de manera apropiada por una persona experta en la técnica dependiendo de los activadores de señalización de TGF β que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa una proteína tal como TGF β 1, TGF β 2, o TGF β 3 como activador de señalización de TGF β , su concentración es de 0,1 ng/ml a 100 ng/ml, preferentemente de 1 ng/ml a 10 ng/ml, más preferentemente, de 5 ng/ml a 10 ng/ml. Además, cuando se usa IDE1 o IDE2, su concentración es de 1 μ M a 100 μ M, preferentemente de 25 μ M a 75 μ M, más preferentemente de 40 μ M a 60 μ M.

En la etapa (ii), se pueden usar los derivados de ácido retinoico como se ejemplifica en la etapa (i). El derivado de

ácido retinoico preferible es AM580 o TTNPB. La concentración de un derivado de ácido retinoico usada en esta etapa se puede determinar de manera apropiada por una persona experta en la técnica dependiendo de los derivados de ácido retinoico que se vayan a utilizar. Por ejemplo, cuando se usa AM580 o TTNPB como derivado del ácido retinoico, su concentración es de 0,01 μM a 100 μM , preferentemente de 0,1 μM a 10 μM , más preferentemente de 0,5 μM a 2 μM .

En las etapas (ii), (ii-1) y (ii-2), la temperatura de cultivo puede ser, pero sin limitación, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C, y el cultivo se lleva a cabo en una atmósfera de aire que contiene CO₂. La concentración de CO₂ es de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %, preferentemente, de aproximadamente el 5 %. No existe un límite superior para el período de cultivo porque el cultivo a largo plazo no afecta particularmente a la eficacia de la producción de las células progenitoras renales. Por ejemplo, el período de cultivo en la etapa (ii) es de 3 días o más, preferentemente, de 3 días o más a 12 días o menos, más preferentemente, de 3 días o más a 9 días o menos. Cuando la etapa (ii) comprende las etapas (ii-1) y (ii-2), el período de cultivo en la etapa (ii) es tal como se describe anteriormente, mientras que el período de cultivo en la etapa (ii-1) es, por ejemplo, de 1 día o más, preferentemente, de 2 días o más a 11 días o menos, más preferentemente, de 2 días o más a 6 días o menos, y el período de cultivo en la etapa (ii-2) es, por ejemplo, de 1 día o más, preferentemente, de 2 días o más a 11 días o menos, más preferentemente, de 3 días o más a 6 días o menos. En este caso, un medio se intercambia deseablemente cada 3 días.

También se desvelan: células progenitoras renales obtenidas por los métodos descritos anteriormente; una composición farmacéutica que comprende las células progenitoras renales; un fármaco terapéutico para nefropatías que comprende las células progenitoras renales; un método para tratar una nefropatía que comprende una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las células progenitoras renales; las células progenitoras renales para su uso en el tratamiento de enfermedades renales; y el uso de las células progenitoras renales en la fabricación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de nefropatías. Los ejemplos de un método para administrar el medicamento terapéutico a pacientes que necesitan tratamiento incluyen: un método que comprende preparar una lámina o láminas de las células progenitoras renales obtenidas y aplicar la lámina o láminas a los riñones de pacientes; un método que comprende trasplantar a pacientes directamente una suspensión celular, que se prepara suspendiendo las células progenitoras renales obtenidas en solución salina fisiológica o similar, o una masa de células, que se prepara mediante cultivo tridimensional de las células progenitoras renales obtenidas (por ejemplo, Dev Cell. 11 de septiembre de 2012; 23 (3): 637-651), en riñones de pacientes; y un método para trasplantar la masa de células progenitoras renales preparadas mediante cultivo tridimensional en una estructura de andamiaje compuesta por Matrigel o similares. El sitio de trasplante no está particularmente limitado siempre que esté dentro del riñón, sin embargo, y preferentemente, es una subcápsula renal. Los ejemplos de nefropatías incluyen lesión renal aguda, insuficiencia renal crónica y nefropatías crónicas que no alcanzan la etapa de insuficiencia renal crónica.

De acuerdo con la presente divulgación, el número de células progenitoras renales contenidas en un fármaco terapéutico para nefropatías no está particularmente limitado siempre que se logre el trasplante de injerto después de la administración. Se puede aumentar o disminuir adecuadamente de acuerdo con la lesión del paciente o el tamaño del cuerpo.

Ejemplos

La presente invención se describe en más detalle con referencia a los Ejemplos a continuación.

[Ejemplo 1]

[Establecimiento de la línea celular iPS humana con inserción de OSR1-GFP y SIX2-GFP]

Se administraron células iPS humanas (201B7) del profesor Shinya Yamanaka, Universidad de Kyoto (Kyoto, Japón), y se cultivaron por un método convencional (Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72). Posteriormente, se preparó una línea celular iPS humana con el reportero OSR1-GFP, que es capaz de expresar GFP de manera operativa unida a la expresión endógena de OSR1, por el método descrito en Mae S, et al, Nat Commun. 4: 1367, 2013. A continuación, tal como se desvela en Mae et al. (anteriormente citado), el IRES-tdTomato se introdujo aguas abajo del codón de parada de SIX2 de la línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP mediante recombinación homóloga usando un clon de BAC (RP11-819H19, Children's Hospital Oakland Research Institute) en el que se había insertado el IRES-tdTomato, produciendo así una línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato que es capaz de expresar tdTomato de manera operativa unido a la expresión endógena de SIX2.

[Ejemplo 2]

[Método de inducción de células SIX2-positivas 1]

<Etapa 1>

La línea celular iPS humana indicadora con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato obtenida por el método del Ejemplo

1 se cultivó a 37 °C en una atmósfera con el 2-5 % de CO₂ para que se vuelva confluyente en placas de 10 cm que contienen un medio celular ES/iPS de primates (ReproCELL) suplementado con 5 ng/ml de bFGF (Wako) con el uso de células SNL (McMahon, A.P. y Bradley, A. (1990) Cell 62; 1073-1085) (tratando a las células con 15,5 µg/ml de mitomicina (Kyowa Hakkō Kirin Co., Ltd.) durante 2 a 3 horas y se sembró a una densidad de 3 x 10⁵ células/placa de 10 cm) como células alimentadoras. Se añadió una solución CTK (tripsina al 2,5 % (Invitrogen), 1 mg/ml de colagenasa IV (Invitrogen), CaCl₂ 0,1 M, 10 ml de KnockOut SR (Invitrogen) y 29,5 ml de H₂O) para disociar las células. Después de retirar las células alimentadoras, las células disociadas se suspendieron en un medio DMEM/F12 que contenía CHIR99021 1 µM (Stemgent, 04-0004), 100 ng/ml de Activina A (R&D Systems, 338-AC), GlutaMAX al 1% (100X) (Invitrogen, 35050-061), FBS al 2 % (Hyclone) y PenStrep al 0,5 % (Invitrogen, 10565). A continuación, las suspensiones celulares se transfirieron a una placa de baja unión celular (PLACA DE BAJA UNIÓN CELULAR DE 6 POCILLOS (Nunc, 145383)) de modo que cada pocillo contenía entre un tercio y un sexto de la suspensión celular obtenida de la placa de 10 cm, seguida del cultivo en suspensión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 días.

15 <Etapa 2>

La masa celular obtenida en la etapa 1 se transfirió a un placa de 24 pocillos o de 6 pocillos recubierta con Matrigel (BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences, 356230) (estando la placa recubierta con Matrigel de 0,2 mg/ml en DMEM y se trató) a 37 °C durante 30 minutos o a 4 °C durante la noche) o un placa de 24 pocillos o 6 pocillos recubierta con Synthemax (Sustrato Corning Synthemax II-SC (Corning, 3535XX1)) (estando la placa recubierta con Synthemax diluido 40 veces con agua estéril y tratada a temperatura ambiente durante 2 horas). El medio se intercambió con un medio DMEM/F12 que contenía CHIR99021 1 µM, 100 ng/ml de BMP7 (BMP7 humano recombinante (R&D Systems, 3534-BP)), 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X) (Invitrogen, 21985), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 % (Invitrogen), AANE MEM 0,1 mM (Invitrogen, 11140), y PenStrep al 0,5 %, seguido de cultivo de adhesión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 3 a 6 días. En el caso de cultivo durante 3 días o más, el medio se intercambió cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones.

<Etapa 3>

30 El medio se retiró de las células obtenidas en la etapa 2. Las células se lavaron con PBS y luego el medio se intercambió con un medio DMEM/F12 que contenía 5 ng/ml de TGFβ1 (Peprotech, 100-21C), Dorsomorina 0,5 µM (inhibidor de AMPK, Compuesto C (Merck, 171260)), 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, seguido de cultivo en suspensión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 15 a 22 días. En este caso, el medio se intercambió cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones. La tasa de células SIX2-tdTomato-positivas para las células obtenidas se determinó utilizando un citómetro de flujo (Becton, Dickinson and Company) para la evaluación, y se descubrió que era del 21,5 ± 2,0 % (Fig. 1B).

[Ejemplo 3]

40 [Método de inducción de células SIX2-positivas 2]

<Etapa 1>

45 La línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato obtenida por el método del Ejemplo 1 se cultivó de la manera descrita en la etapa 1 del método de inducción 1 para que volviese confluyente en placas de 10 cm usando células SNL como células alimentadoras. Se añadió una solución CTK para disociar las células. Después de retirar las células alimentadoras, las células disociadas se suspendieron en un medio DMEM/F12 que contenía TTNPB 1 µM (Sigma, T3757), CHIR99021 1 µM, GlutaMAX al 1 % (100X), FBS al 2 % y PenStrep al 0,5 %. A continuación, las suspensiones celulares se transfirieron a una placa de baja unión celular (PLACA DE BAJA UNIÓN CELULAR DE 6 POCILLOS) de manera que cada pocillo contenía entre un tercio y un sexto de la suspensión celular obtenida de la placa de 10 cm, seguida del cultivo en suspensión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 días.

55 <Etapa 2>

La masa celular obtenida en la etapa 1 se transfirió a placas recubiertas con Matrigel o placas recubiertas con Synthemax (preparado de la manera descrita en la etapa 2 del método de inducción 1). El medio se intercambió con un medio DMEM/F12 que contiene TTNPB 1 µM, 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, seguido de cultivo de adhesión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 3 a 9 días. En este caso, el medio se intercambió cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones.

<Etapa 3>

65 El medio se retiró de las células obtenidas en la etapa 2. Las células se lavaron con PBS y luego el medio se

intercambió con un medio DMEM/F12 que contenía 5 ng/ml de TGFβ1, Dorsomorfin 0,5 μM, 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, seguido de cultivo en suspensión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 12 a 22 días. En este caso, el medio se intercambiaba cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones. La tasa de células SIX2-tdTomato-positivas en las células obtenidas se determinó usando un citómetro de flujo para la evaluación, y se descubrió que era de 20,6 ± 5,3 % (Fig. 1C).

[Ejemplo 4]

10 [Método de inducción de células SIX2-positivas 3]

<Etapa 1>

15 La línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato obtenida por el método del Ejemplo 1 se cultivó de la manera descrita en la etapa 1 del método de inducción 1 para que volviese confluyente en placas de 10 cm usando células SNL como células alimentadoras. Se añadió una solución CTK para disociar las células. Después de retirar las células alimentadoras, se añadió Accutase (TM) (Innovative Cell Technologies, AT-104) para dispersar las células iPS para dar como resultado células individuales. A continuación, las células obtenidas se suspendieron en un medio DMEM/F12 que contenía Y-27632 10 μM (Wako, 253-00513), CHIR99021 1 μM, TTNPB 1 μM, GlutaMAX al 1 % (100X), FBS al 2 % y PenStrep al 0,5 %. Las suspensiones celulares obtenidas (1 x 10⁵ células/pocillo (para una placa de 96 pocillos)) se transfirieron a una placa recubierta con gelatina al 0,1 % (Gelatina de piel porcina, Tipo A (Sigma, G1890)), seguido de cultivo de adhesión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 días.

<Etapa 2>

25 Las células obtenidas en la etapa 1 se lavaron con PBS. El medio se intercambiaba con un medio DMEM/F12 que contiene TTNPB 1 μM, 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, seguido de cultivo de adhesión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 3 a 9 días. En este caso, el medio se intercambiaba cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones.

<Etapa 3>

30 Se añadió Accutase (TM) a las células obtenidas en la etapa 2 para disociar las células. Las células OSR1-positivas se clasificaron por FACS usando la expresión de OSR1 (GFP) como indicador. Las células OSR1-positivas obtenidas se transfirieron a una placa de baja unión celular (PLACA DE BAJA UNIÓN CELULAR DE 6 POCILLOS) a 1 x 10⁶ células/pocillo en un medio DMEM/F12 que contiene 5 ng/ml de TGFβ1, Dorsomorfin 0,5 μM, 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, seguida del cultivo en suspensión a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 días. La masa de células obtenida se transfirió a placas recubiertas con Matrigel (BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced), y posteriormente se sometió a cultivo de adhesión en un medio DMEM/F12 que contenía 5 ng/ml de TGFβ1, Dorsomorfin 0,5 μM, 2-mercaptoetanol al 0,1 % (1000X), GlutaMAX al 1 % (100X), KnockOut SR al 10 %, AANE MEM 0,1 mM, y PenStrep al 0,5 %, a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 a 13 días. En este caso, el medio se intercambiaba cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones. La tasa de células SIX2-tdTomato-positivas en las células obtenidas se determinó usando un citómetro de flujo para la evaluación, y se descubrió que era de 31,1 ± 10,0 % (Fig. 1D).

[Ejemplo 5]

50 [Examen utilizando alternativas para la dorsomorfin]

En la etapa 3 del método 1 de inducción de células SIX2-positivas, la dorsomorfin se reemplazó con 100 ng/ml de noggin (Peprotech), LDN193189 0,5 μM (Axon MedChem, 1509), o DMH1 0,5 μM (Tocris, 4126) para la inducción de diferenciación de la manera mencionada anteriormente. Como resultado, se descubrió que las tasas de células SIX2-tdTomato-positivas fueron del 7,5 %, 20,4 % y 15,4 %, respectivamente (Fig. 2B, 2C y 2D, respectivamente).

55 [Examen utilizando alternativas para TGFβ1]

60 En la etapa 3 del método 1 de inducción de células SIX2-positivas, TGFβ1 se intercambiaba con IDE1 50 μM (Tocris) o IDE2 50 μM (Tocris) para la inducción de diferenciación de la manera mencionada anteriormente. Como resultado, las tasas de células positivas para SIX2-tdTomato fueron del 8,4 % y del 39,4 %, respectivamente (Fig. 2E y 2F).

[Examen utilizando una combinación de alternativas]

65 En la etapa 3 del método 1 de inducción de células SIX2-positivas, la dorsomorfin se reemplazó con LDN193189 0,5 μM, mientras que TGFβ1 con 10 ng/ml de TGFβ2 (Peprotech) o 10 ng/ml de TGFβ3 (R&D), para la inducción de diferenciación de la manera mencionada anteriormente. Como resultado, las tasas de células SIX2-positivas fueron

del 8,6 % y del 9,3 %, respectivamente (Fig. 2G y 2H).

[Ejemplo 6]

5 [Establecimiento de la línea celular iPS humana con inserción de OSR1-GFP y SIX2-tdTomato]

Se preparó una línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato (4A6C3-10) a partir de la línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP (3D45) descrita en Mae S, et al., Nat Commun. 4: 1367, 2013 usando un método similar al del Ejemplo 1.

10

[Ejemplo 7]

[Método de inducción de células SIX2-positivas 4]

15 <Etapa 1>

Se cultivó una línea celular iPS humana con reportero OSR1-GFP y SIX2-tdTomato obtenida por el método descrito en el Ejemplo 6 4A6C3-10 a 37 °C en una atmósfera de CO₂ del 2 % al 5 % para que se vuelva confluyente del 70 % al 80 % en placas de 10 cm que contienen un medio ES de primates (ReproCELL) suplementado con 500 U/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y 5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante básico (bFGF, Wako) con el uso de fibroblastos embrionarios de ratón (FEM) que provienen de embriones de ratón ICR (feto de 12,5 días de vida) o células alimentadoras de SNL (McMahon, A.P. y Bradley, A. (1990) Cell 62; 1073-1085) (estas células se trataron previamente con 15,5 µg/ml de mitomicina (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) durante 2 a 3 horas y se sembraron a una densidad de 2 x 10⁵ células/placa de 6 cm) como células alimentadoras. Las placas de 10 cm que contenían las células se enjuagaron con PBS y se trataron con una solución de CTK (PBS que contenía tripsina al 0,25 % (Invitrogen), colagenasa IV al 0,1 % (Invitrogen), KnockOut SR al 20 % (KSR, Invitrogen) y CaCl₂ 1 mM) a 37 °C durante 4 minutos. La solución CTK se eliminó enjuagando con PBS. A continuación, el medio se intercambió con DMEM/F12 + Glutamax (Invitrogen) que contiene AANE MEM 0,1 mM (Invitrogen), 1000 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,55 M (Invitrogen) y KSR al 20 %. Posteriormente, las células se rasparon usando un raspador de células y se sembraron en placas de 6 cm recubiertas con gelatina al 0,2 % para eliminar las células alimentadoras. Una hora más tarde, las células se lavaron con DMEM/F12 + Glutamax [medio de etapa 1] que contenía 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 2 % (HyClone), se transfirieron a placas de fijación ultrabaja (Corning 3471) que tienen un medio de etapa 1 que contiene 100 ng/ml de Activina A recombinante de humano/ratón/rata (R&D Systems) y CHIR99021 1 µM, y se cultivó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 2 días.

<Etapa 2>

Para diferenciarse en el mesodermo intermedio, la masa de células (cuerpo embrioide (EB)) obtenida en la etapa 1 se transfirió a una placa de 24 pocillos recubierta con Synthemax II (Corning), el medio se intercambió con DMEM/F12 + Glutamax que contenía AANE MEM 0,1 mM, 500 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,55 mM, KSR al 10 %, 100 ng/ml de BMP7 (BMP7 humano recombinante, R&D Systems) y CHIR99021 1 µM, y las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 3 días.

45 <Etapa 3>

Después de la etapa 2, el medio se intercambió con DMEM/F12 + Glutamax que contenía AANE MEM 0,1 mM, 500 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,55 mM, KSR al 10 %, TNPB 1 µM (Sigma T3757), y 5 ng/ml de TGFβ1 (Peprotech), seguido de cultivo a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 5 días. El medio se intercambió con un medio que tenía las mismas condiciones dos días después del comienzo del cultivo (es decir, el día 8 desde el comienzo de la etapa 1 (día 1)).

<Etapa 4>

Después de la etapa 3, el medio se intercambió con DMEM/F12 + Glutamax que contenía AANE MEM 0,1 mM, 500 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,55 mM, KSR al 10 %, 5 ng/ml de TGFβ1 y DMH1 0,5 µM (Tocris), seguido de cultivo a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 17 días (es decir, cultivo durante 28 días en total desde el inicio de la etapa 1 (día 1); Fig. 3A). En este caso, el medio se intercambió cada 3 días con un medio que tenía las mismas condiciones. La tasa de células OSR1-positivas y SIX2-positivas (OSR1+SIX2+) en las células obtenidas se determinó usando un citómetro de flujo para la evaluación, y se descubrió que era del 32,8 % en el día 28 de cultivo (Fig. 3B). Además, la tasa de células OSR1+SIX2+ alcanzó el nivel máximo en el día 25 de cultivo y luego se confirmó que se mantuvo hasta el día 28 de cultivo (Fig. 3D).

[Ejemplo 8]

65

[Examen utilizando diferentes combinaciones de activadores de señalización de TGFβ e inhibidores de BMP]

La inducción de células OSR1+SIX2+ de la línea celular de iPS 4A6C3-10 se examinó usando diferentes combinaciones de activadores de señalización de TGFβ e inhibidores de BMP. De manera específica, la inducción de células OSR1+SIX2+ de 4A6C3-10 se examinó en las condiciones 1) a 10) descritas a continuación.

5 En las etapas 1 a 2 en las condiciones 1) a 10), se usaron los métodos usados en las etapas 1 a 2 del Ejemplo 7, respectivamente. En la etapa 3 en las condiciones 1) a 7) y 10), se usó el método usado en la etapa 3 del Ejemplo 7. En la etapa 3 en la condición 8), el cultivo se realizó en el mismo medio que en la etapa 3 del Ejemplo 7, excepto que 5 ng/ml de TGFβ1 y TTNP 1 μM se reemplazaron con 5 ng/ml de TGFβ2 (Peprotech). En la etapa 3 en la condición 9), el cultivo se realizó en el mismo medio que en la etapa 3 del Ejemplo 7, excepto que 5 ng/ml de TGFβ1 y TTNP 1 μM se reemplazaron con 5 ng/ml de TGFβ3 (Peprotech). En la etapa 4 en las condiciones 1) a 10), el cultivo se realizó mediante el método usado en la etapa 4 del Ejemplo 7, o se realizó en el mismo medio que en la etapa 4 del Ejemplo 7, excepto que 5 ng/ml de TGFβ1 y DMH1 0,5 μM se reemplazaron por lo siguiente: condición 1), DMSO solo; condición 2), 5 ng/ml de TGFβ1; condición 3), DMH1 0,5 μM; condición 4), 5 ng/ml de TGFβ1 y 100 ng/ml de noggin (Peprotech); condición 5), 5 ng/ml de TGFβ1 y dorsomorfina 0,5 μM (Merck); condición 6), 5 ng/ml de TGFβ1 y LDN193189 0,5 μM (Axon MedChem); condición 7), 5 ng/ml de TGFβ1 (Peprotech) y DMH1 0,5 μM (como en el Ejemplo 7); condición 8), 5 ng/ml de TGFβ2 (Peprotech) y DMH1 0,5 μM; condición 9), 5 ng/ml de TGFβ3 (Peprotech) y DMH1 0,5 μM; y condición 10), IDE2 50 μM (Tocris) y DMH1 0,5 μM.

20 Como resultado, (tal como se muestra en la Fig. 4), se confirma que el uso de TGFβ1 como activador de señalización de TGFβ y DMH1 como inhibidor de BMP es eficaz para la inducción de células OSR1+SIX2+. En la etapa 4 del Ejemplo 7, cuando el cultivo se realizó en un medio que contenía SB431542 (Tocris) (10 μM), un inhibidor del receptor 1 de TGFβ, junto con 5 ng/ml de TGFβ1 y DMH1 0,5 μM (condición 11), se inhibió la diferenciación en células OSR1+SIX2+.

25 **[Ejemplo 9]**

[Investigación con el uso de diferentes células iPS humanas y células ES humanas]

30 Quince tipos de células iPS humanas (células iPS derivadas de sangre periférica 585A1, 585B1, 604A1, 604B1, 648A1, 648B1 y 692D2; células iPS derivadas de sangre del cordón umbilical 606A1, 606B1 y 610B1; células iPS derivadas de fibroblastos dérmicos humanos adultos (aHDF) 201B6, 201B7, 253G1 y 253G4; y 4A6C3-10) y tres tipos de células ES humanas (khES1, khES3 y H9) (Proc Natl Acad Sci EE.UU. 109, 12538-12543 (2012), Stem Cells 31, 458-466 (2013)) se trataron por el método descrito en el Ejemplo 7 y luego se analizaron para determinar la expresión génica de OSR1 y SIX2 usando RT-PCR cuantitativa (Nat Commun 4, 1367, (2013)). La expresión de OSR1 y SIX2 en una pluralidad de líneas celulares distintas de 4A6C3-10 se confirmó mediante el método descrito en el Ejemplo 7 (Fig. 5). Por lo tanto, se confirmó que el método podría aplicarse a otras células iPS y células ES.

40 **[Ejemplo 10]**

[Análisis de marcadores de expresión]

45 Se analizaron diversos marcadores de expresión en 4A6C3-10 tratadas en la etapa de inducción del Ejemplo 7 usando RT-PCR o RT-PCR cuantitativa. Las Fig. 3C y 3E muestran los resultados. La expresión de BRACHYURY y TBX6 que sirven como marcadores para el mesodermo naciente posterior temprano se confirmó en las células después de la etapa 1, y la expresión de OSR1 que sirve como un marcador de mesodermo intermedio se confirmó en las células después de la etapa 2 (Fig. 3C). A continuación, se activó la expresión de los genes WT1, PAX2, SIX2 y HOX posterior que sirven como marcadores mesenquimales metanéfricos (Fig. 3C). La expresión de CITED1, EYA1, PAX2, WT1, SALL1, ITGA8, CDH11, GDNF, HOXA11 y HOXD11 que sirven como marcadores de células progenitoras renales se confirmaron en células OSR1+SIX2+ el día 28 de cultivo. Por el contrario, FOXD1 que sirve como marcador estromal, y HOXB7 que sirve como conducto mesonéfrico y marcador de la yema ureteral no se detectaron en las células (Fig. 3E).

55 [Evaluación de células progenitoras renales]

60 Las células OSR1+SIX2+ en el día 28 de cultivo tratadas en la etapa de inducción del Ejemplo 7 se aislaron por citometría de flujo, se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con Synthemax II a una densidad de 3,0 x 10⁴ células/pocillo, y se cultivaron en medio REGM (LONZA) suplementado con Y-27632 10 μM a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 7 días. Las células obtenidas se sometieron a inmunotinción contra NEPHRIN (un marcador de podocitos glomerulares), AQP1 y MEGALIN (marcadores de túbulos proximales) y UROMUCOID (un marcador del asa de Henle) para confirmar las células positivas para cada marcador (Fig. 6A).

65 Posteriormente, las células OSR1+SIX2+ se sembraron en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo de husillo (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase a continuación) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) a una densidad de 1,0 x 10⁵ células/pocillo y cultivadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. A continuación, el medio se intercambió con un

sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 2 a 3 días. A continuación, las células se recuperaron, se sembraron en NIH3T3 tratado con mitomicina capaz de expresar Wnt4 (Osafune K, et al. (2006), Development 133: 151-61) a una densidad de $3,0 \times 10^4$ células/pocillo (placa de 24 pocillos), y se cultivaron durante 5 a 7 días. Las células obtenidas se sometieron a inmunotinción contra lectina de Lotus Tetragonolobus (LTL) (un marcador de túbulo proximal), LAMININ (un marcador de células epiteliales polarizadas), CDH1 (un marcador de túbulo distal), y PODOCALYXIN y WT1 (marcadores de podocitos glomerulares) para confirmar las células positivas para cada marcador (Fig. 6B).

Además, las células OSR1+SIX2+ se sometieron a cultivo de órganos junto con una médula espinal embrionaria de ratón E11.5. De manera específica, las células OSR1+SIX2+ se sembraron en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo de husillo (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase a continuación) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo y cultivadas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 % durante 24 horas. Posteriormente, el medio se intercambió con un sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 2 a 3 días. Posteriormente, las células se recuperaron y se cultivaron con una médula espinal embrionaria de ratón E11.5 en el límite entre el aire y una solución de cultivo en un filtro de policarbonato (Millipore) que tenía poros de 0,4 μm a 37 °C. Se aplicó DMEM (Nacalai Tesque) suplementado con 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 10 % al lado de la solución de cultivo (Osafune K, et al. (2006), Development 133: 151-61). Una semana después, las células obtenidas se sometieron a inmunotinción contra LTL, LAMININ, CDH1, PODOCALYXIN y WT1 para confirmar las células positivas para cada marcador (Fig. 6C).

De forma similar, las células OSR1+SIX2+ se sometieron a cultivo de órganos junto con metanefros embrionarios de ratón E11.5. De manera específica, las células OSR1+SIX2+ se sembraron en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo de husillo (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase a continuación) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo y cultivadas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 % durante 24 horas. Posteriormente, el medio se intercambió con un sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 2 a 3 días. A continuación, las células se recuperaron y se disociaron usando Accumax. El metanefros embrionario de ratón E11.5 se obtuvo de ratones ICR, se cortó en DMEM, se dejó en tripsina-EDTA al 0,05 % durante 10 minutos, y se disoció por pipeteo. Las células metanefricas embrionarias de ratón separadas de este modo se dejaron reposar en DMEM suplementado con 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 10 % a 37 °C durante 10 minutos y se filtraron a través de un filtro de células (BD) de 40 μm . Las células metanefricas embrionarias de ratón obtenidas ($5,0 \times 10^5$ células) se mezclaron con las células OSR1+SIX2+ anteriores ($5,0 \times 10^5$ células) disociadas usando Accumax. Las células mezcladas se cultivaron un día y una noche completos en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con forma de huso en DMEM suplementado con Y-27632 10 μM , 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 10 % para formar agregados. Los agregados obtenidos se cultivaron en la interfase aire-fluido en un filtro de policarbonato (Millipore) que tenía poros de 0,4 μm a 37 °C. Se aplicó DMEM (Nacalai Tesque) suplementado con 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 10 % al lado de la solución de cultivo (Uchino, S. et al. JAMA294, 813-818 (2005)). Una semana después, las células obtenidas se sometieron a inmunotinción contra CDH6 (un marcador de vesícula renal), LTL, LAMININ, CDH1, PODOCALYXIN y WT1 para confirmar las células positivas para cada marcador (Fig. 6D).

Además, Las células OSR1+SIX2+ se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo en forma de huso (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase a continuación) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Posteriormente, el medio se intercambió con un sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 2 a 3 días. A continuación, las células se recuperaron y se trasplantaron en almohadillas de grasa epididimaria de ratones inmunodeficientes (NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J (Charles river)). Treinta días después, se recogieron tejidos en los sitios de trasplante. Como resultado, se observó una estructura similar a un túbulo proximal positiva para LTL y LAMININA (Fig. 6E).

Además, las células de cada fracción en el día 28 de cultivo (OSR1-SIX2-, OSR1+SIX2-, OSR1-SIX2+y OSR1+SIX2+) tratadas en la etapa de inducción del Ejemplo 7 se sometieron a cultivo de órganos junto con una yema ureteral embrionaria de ratón E11.5. De manera específica, las células derivadas de iPSC se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo en forma de huso (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase a continuación) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 % durante 24 horas. Posteriormente, el medio se intercambió con un sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 2 a 3 días. A continuación, las células se recuperaron y se disociaron usando Accumax. Se obtuvo una yema ureteral embrionaria de ratón E11.5 de un ratón ICR. Las células de la yema ureteral embrionaria de ratón obtenidas ($5,0 \times 10^5$ células) se mezclaron con las células disociadas ($5,0 \times 10^5$ células) usando Accumax de cada uno de los grupos de células OSR1-SIX2-, OSR1+SIX2-, OSR1-SIX2+ y OSR1+SIX2+. Las células mezcladas se cultivaron un día y una noche completos en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo de huso en DMEM suplementado con 500 U/ml Y-27632 10 μM de penicilina/estreptomicina, y FBS al 10 % para formar agregados. Los agregados obtenidos se cultivaron en la interfase

aire-fluido en un filtro de policarbonato (Millipore) que tenía poros de 0,4 μm a 37 °C. Se aplicó DMEM (Nacalai Tesque) suplementado con 500 U/ml de penicilina/estreptomicina y FBS al 10 % al lado de la solución de cultivo (Uchino, S. et al. JAMA 294, 813-818 (2005)). Una semana después, se observaron los agregados celulares obtenidos y, como resultado, los agregados formados con células OSR1+SIX2+ tenían exclusivamente una estructura tubular (Fig. 6F, izquierda). Además, los agregados formados con las células OSR1+SIX2+ se sometieron a inmunotinción contra DBA (un marcador de yema ureteral) y, como resultado, se confirmaron ramas derivadas de yemas ureterales de ratón (Fig. 6F, derecha).

Los resultados anteriores indicaron que las células OSR1+SIX2+ inducidas por diferenciación mediante el método descrito en el Ejemplo 7 eran células progenitoras renales.

[Sobrenadante de cultivo UBC]

Se preparó un medio acondicionado con células de yema uretral (UBC, por sus siglas en inglés) mediante una versión modificada del método descrito en Am J Physiol 273, F757-767 (1997). El UBC (proporcionado por el Dr. Sakurai, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 94, 6279-6284 (1997)) se cultivó en un medio mínimo esencial (MEM; Invitrogen) que contiene suero fetal bovino (FBS) al 10 %. Cuando las células se volvieron confluentes al 80 %, se enjuagaron con PBS y el medio se intercambió con DMEM/F12 + Glutamax que contenía AANE MEM 0,1 mM, 500 U/ml de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,55 mM y KSR al 10 %. A continuación, las células se cultivaron durante 3 días para obtener un sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo se filtró a través de un filtro de 0,22 μm antes de su uso.

[Ejemplo 11]

[Efecto terapéutico de las células progenitoras renales derivadas de iPS humanas]

Las células progenitoras renales derivadas de iPS humana (células OSR1+SIX2+; también conocida como "RP-OS") y un grupo celular que contiene células progenitoras renales derivadas de iPS humanas (células OSR1+SIX2- y células OSR1+SIX2+; también conocido como "hiPSC-RP"), que se obtuvieron en los días 25 a 28 después de la inducción de diferenciación por el método descrito en el Ejemplo 7, se aislaron por citometría de flujo. Cada una de las células y el grupo celular se sembró a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con fondo en forma de huso (Lipidure Coat, NOF) que contiene un sobrenadante de cultivo UBC (véase anteriormente) suplementado con 50 ng/ml de BMP7 (R&D Systems) e Y-27632 10 μM (Wako) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. A continuación, el medio se intercambió con un sobrenadante de cultivo UBC suplementado con 50 ng/ml de BMP7, 0,5 μM de BIO (Wako) e Y-27632 10 μM , seguido de cultivo durante 24 horas. Como control, se sembraron células iPS humanas no diferenciadas (4A6C3-10) a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de baja adherencia con forma de huso que contiene un medio de células ES de primate (ReproCELL) suplementado con Y-27632 10 μM , seguido de cultivo a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 48 horas. Las células cultivadas se lavaron con solución salina fisiológica para eliminar el medio. Entonces, tal como se describe continuación, se trasplantaron 15 masas de células hiPSC-RP bajo las subcápsulas renales de modelos de ratón con lesión renal aguda (LRA). Además, se llevaron a cabo experimentos para confirmar la diferenciación tisular de las células OSR1+SIX2+ (Fig. 7A y 7B) inyectando cinco masas de células RP-OS en el parénquima renal de un modelo de LRA de ratón o un modelo de ratón con insuficiencia renal crónica mediante pipeteo tal como se describe a continuación.

[Prueba de modelo de lesión renal aguda (LRA) en ratón]

Se preparó un modelo de LRA de isquemia-reperfusión en ratón de acuerdo con un método conocido (Aging Cell 8, 192-200 (2009), J Am Soc Nephrol 20, 1544-1555 (2009), J Am Soc Nephrol 25, 316-328 (2014)). Los ratones hembra inmunodeficientes de seis semanas de edad (NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J (Charles River)) se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se mantuvieron a 37 °C. Se realizó una incisión de frank en cada ratón para realizar una nefrectomía derecha. Entonces, la arteria renal izquierda se bloqueó usando un pinzamiento microvascular no traumático (Natsume Seisakusho Co., Ltd., Japón) durante 45 minutos. Se quitó el pinzamiento y luego se trasplantaron RP-OS, hiPSC-RP o 4A6C3-10 en el ratón (y se inyectó solución salina fisiológica en ratones de control). Los niveles de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y creatinina sérica (Cr), que son marcadores de la función renal en sangre periférica de ratón, se determinaron usando DRI-CHEM 7000VZ (FUJIFILM, Japón). El establecimiento del estado de LRA se confirmó con un aumento en el nivel de NUS (> 41 mg/dl) después de la isquemia-reperfusión sin infarto renal. Para el análisis de tejido renal, la tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) o tricromo de Masson (MT) se realizó el día 3 después de la isquemia-reperfusión (I/R).

[Prueba de modelo de insuficiencia renal crónica en ratón]

Se generó un modelo de insuficiencia renal crónica en ratones (modelo de nefrectomía 5/6) usando un método conocido (Nephrol Dial Transplant 26, 832-838 (2011)). Los ratones hembra inmunodeficientes de seis semanas de edad (NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J) se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se mantuvieron a 37 °C. Después de la nefrectomía derecha, se extrajeron los polos superior e inferior del riñón izquierdo de cada ratón. Dos semanas

después de la cirugía, se trasplantaron masas de células RP-OS en el ratón. Tres días o dos semanas después del trasplante, se sacrificó a los ratones y se probaron secciones de tejido renal mediante inmunotinción.

[Resultados]

5 Dos semanas después del trasplante de RP-OS en parénquima renal, algunas de las células RP-OS trasplantadas se incorporaron al riñón del hospedador para diferenciarse en células positivas para el marcador del túbulo proximal LTL y AQP1 tanto en el modelo de LRA (Fig. 7A) como en el modelo de insuficiencia renal crónica (Fig. 7B). Sin embargo, como resultado del trasplante de RP-OS en el parénquima renal, no se observaron efectos obvios sobre la función renal en ninguno de los modelos (datos no mostrados). Debido a que existe un informe de que el trasplante de subcápsula renal permite la administración de un mayor número de células madre mesenquimales directamente a un riñón dañado en comparación con la inyección intravenosa (Transplant Proc 41, 947-951 (2009)), Los presentes inventores probaron los efectos terapéuticos del trasplante de hiPSC-RP en subcápsula renal. Como resultado, el nivel de NUS y el nivel de Cr en suero disminuyeron significativamente en el grupo de trasplante de hiPSC-RP en los días 2, 4 y 6 después de la isquemia-reperfusión, en comparación con el grupo control y el grupo de trasplante de células iPS humanas no diferenciadas (Fig. 7C). Los resultados del análisis histológico confirmaron que los túbulos dilatados con cilindros en la región del parénquima renal en el grupo de trasplante hiPSC-RP eran significativamente más pequeños que los del grupo de control, y la región de fibrosis en el grupo de trasplante de hiPSC-RP era más estrecha que la del grupo de control (Fig. 7D y 7E). El hecho de que las hiPSC-RP no se incorporasen al riñón del hospedador sugirió que los efectos terapéuticos de las hiPSC-RP confirmados mediante este protocolo se basaban principalmente en acciones paracrinas.

Aplicabilidad industrial

25 Tal como se describe en detalle anteriormente, la presente invención proporciona un método para inducir la diferenciación de células del mesodermo intermedio en células progenitoras renales. Por consiguiente, los presentes inventores describen que las células progenitoras renales producidas por el método se pueden usar para la medicina regenerativa para nefropatías tales como la insuficiencia renal.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kyoto University
Astellas Pharma Inc.

35 <120> Método para producir células progenitoras renales y medicamentos que comprenden las células progenitoras renales

<130> PH-5889-PCT

40 <150> JP2013-123072

<151> 11/06/2013

<150> JP2014-092108

<151> 25/04/2014

45

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> LÍPIDO

<222> 1

<223> MIRISTATO

60

<220>

<221> MOD_RES

<222> 11

<223> FOSFORILACIÓN

65

<220>

<221> MOD_RES

ES 2 794 074 T3

<222> 12
<223> AMIDACIÓN

<400> 1

5

Gly	Lys	Glu	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro
1				5					10		

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células progenitoras renales a partir de células del mesodermo intermedio, que comprende la siguiente etapa de: cultivar las células del mesodermo intermedio en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP, induciendo de este modo las células progenitoras renales a partir de las células del mesodermo intermedio.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las células progenitoras renales son células SIX2-positivas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde las células del mesodermo intermedio son células OSR1-positivas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el activador de señalización de TGF β es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, IDE1 e IDE2.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el inhibidor de BMP es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en dorsomorfinina, noggin, LDN193189 e DMH1.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el activador de señalización de TGF β es TGF β 1, y el inhibidor de BMP es DMH1.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células del mesodermo intermedio son células del mesodermo intermedio inducidas a partir de células madre pluripotentes.
8. El método de la reivindicación 7, en donde las células del mesodermo intermedio son células del mesodermo intermedio producidas por un método que comprende las siguientes etapas de:
 - (i) cultivar células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico; y
 - (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la etapa (ii) comprende las siguientes etapas de:
 - (ii-1) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; y
 - (ii-2) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii-1) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la etapa (ii-1) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene BMP7 y un inhibidor de GSK-3 β , y la etapa (ii-2) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el derivado de ácido retinoico es AM580 o TTNPB.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS).
14. El método de la reivindicación 13, en donde las células iPS son células iPS humanas.
15. El método de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas de:
 - (i) cultivar células madre pluripotentes en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en Activina A, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico;
 - (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en BMP7, un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β y un derivado (o derivados) de ácido retinoico; y
 - (iii) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii) en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un inhibidor (o inhibidores) de BMP.
16. El método de la reivindicación 15, en donde las células progenitoras renales son células SIX2-positivas.

17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde las células obtenidas en la etapa (ii) son células OSR1-positivas.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el activador de señalización de TGF β es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, IDE1 e IDE2.
- 5 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el inhibidor de BMP es una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en dorsomorfina, noggin, LDN193189 e DMH1.
- 10 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el activador de señalización de TGF β es TGF β 1, y el inhibidor de BMP es DMH1.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en donde la etapa (ii) comprende las siguientes etapas de:
- 15 (ii-1) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β ; y
(ii-2) cultivar las células obtenidas en la etapa (ii-1) en un medio que contiene una o más sustancias seleccionadas de uno o más activadores de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.
- 20 22. El método de la reivindicación 21, en donde la etapa (ii-1) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene BMP7 y un inhibidor (o inhibidores) de GSK-3 β , y la etapa (ii-2) es una etapa de realizar el cultivo en un medio que contiene un activador (o activadores) de señalización de TGF β y un derivado (o derivados) del ácido retinoico.
- 25 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en donde el inhibidor de GSK3 β es CHIR99021.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, en donde el derivado de ácido retinoico es AM580 o TTNPB.
- 30 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPS).
26. El método de la reivindicación 25, en donde las células iPS son células iPS humanas.

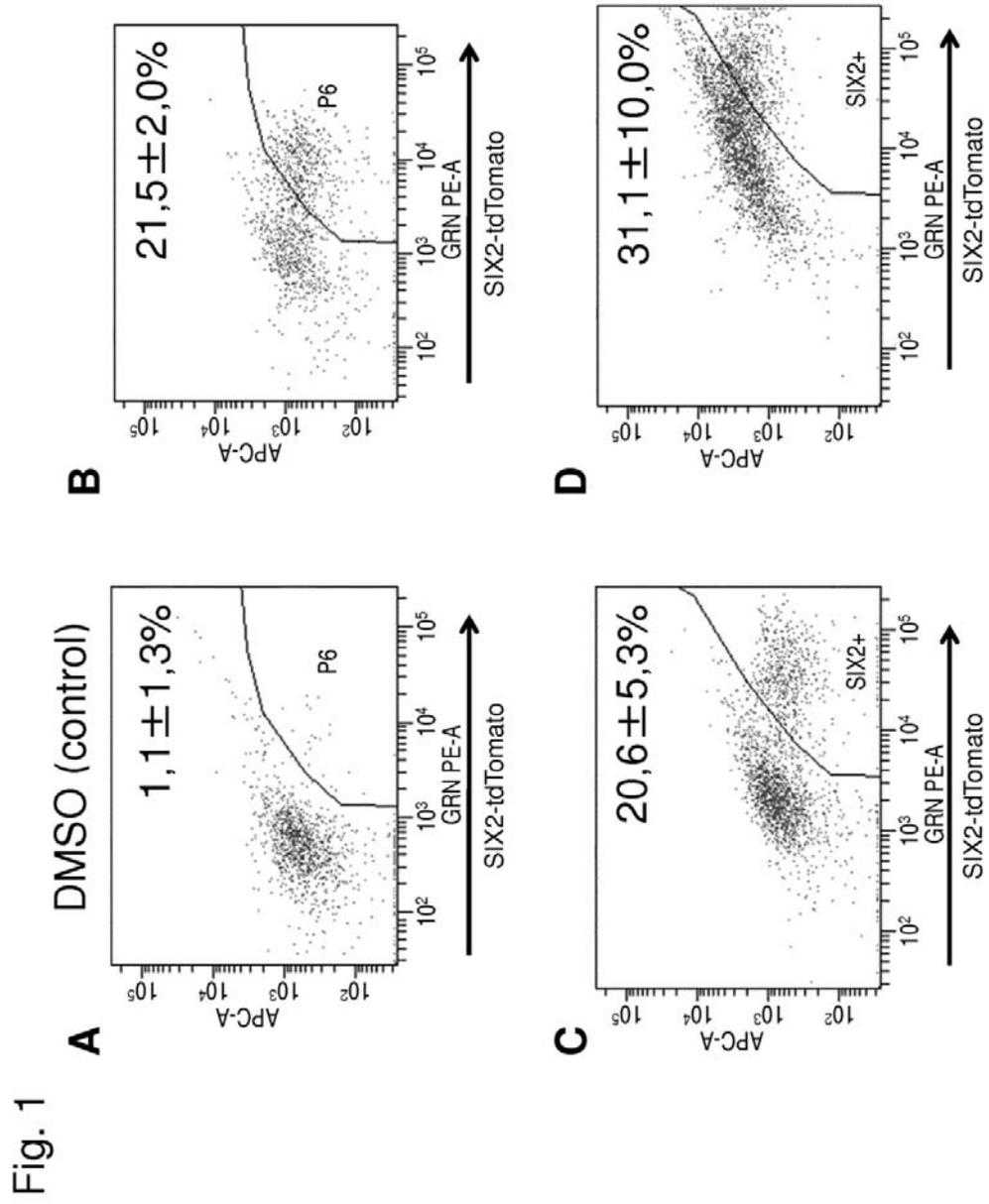


Fig. 2

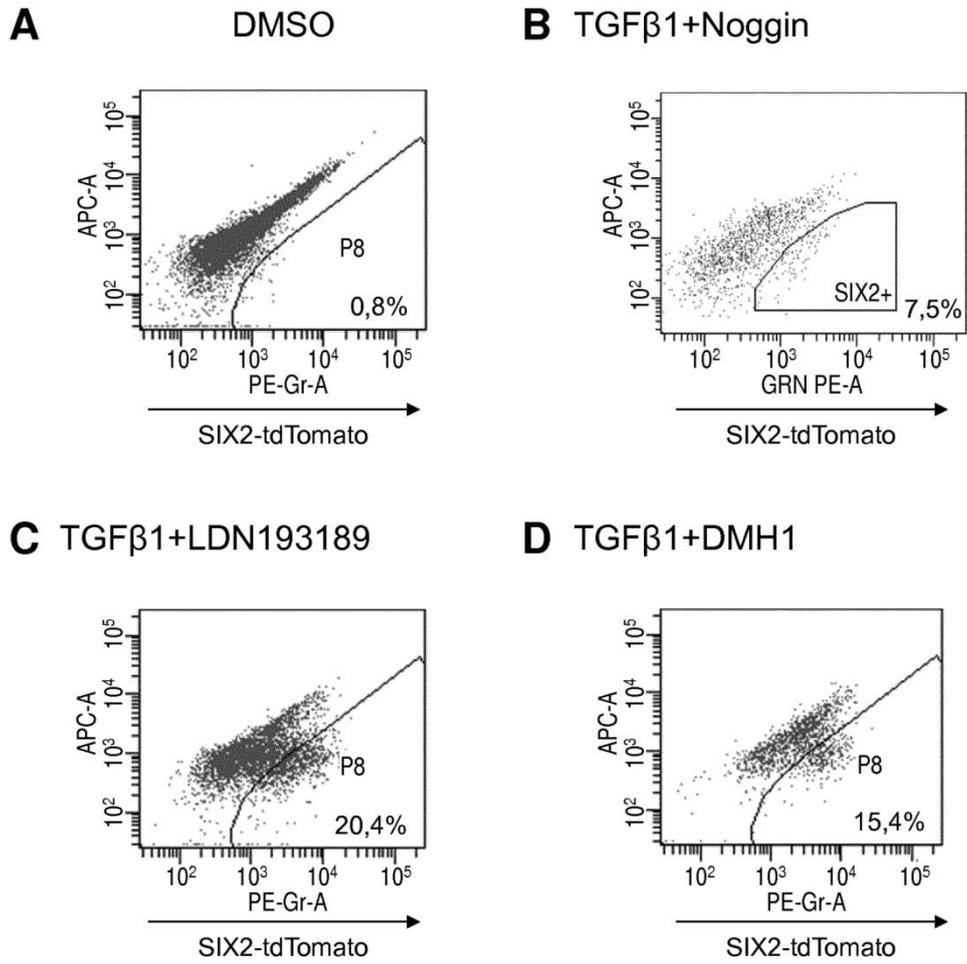
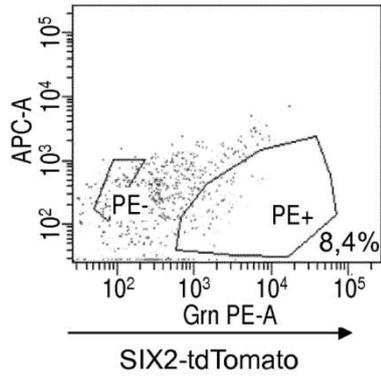
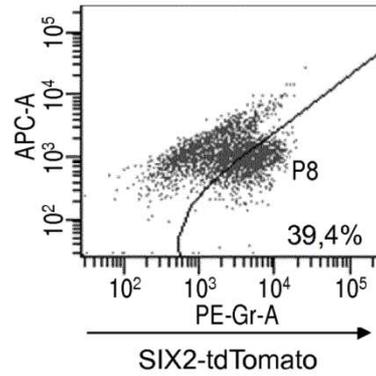


Fig. 2 (Continuación)

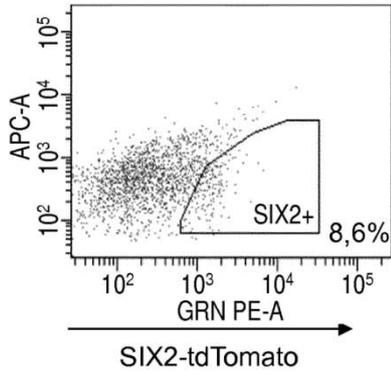
E IDE1+Dorsomorfina



F IDE2+Dorsomorfina



G TGFβ2+LDN193189



H TGFβ3+LDN193189

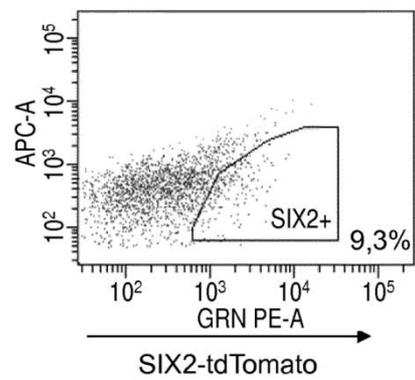


Fig. 3

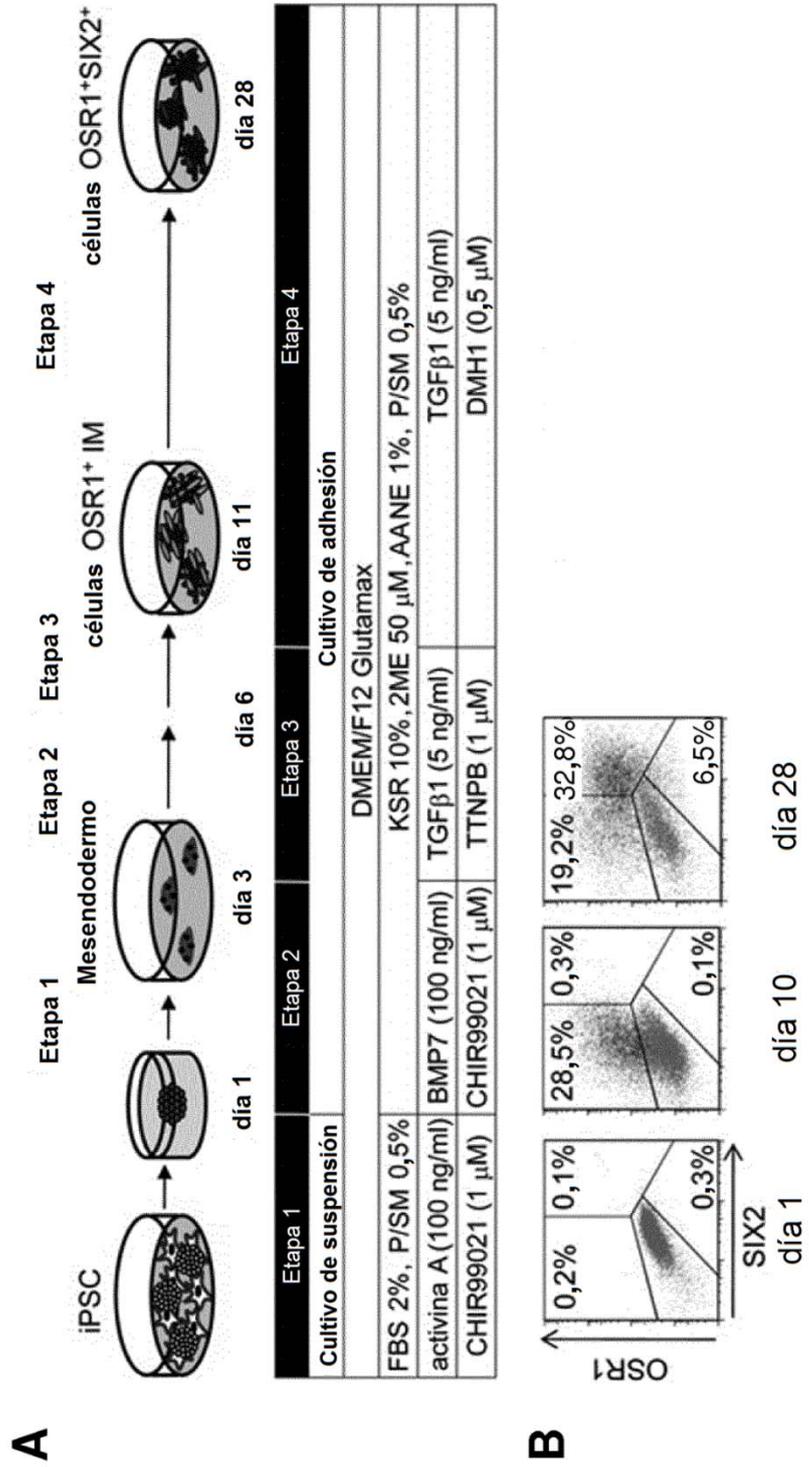


Fig. 3 (Continuación)

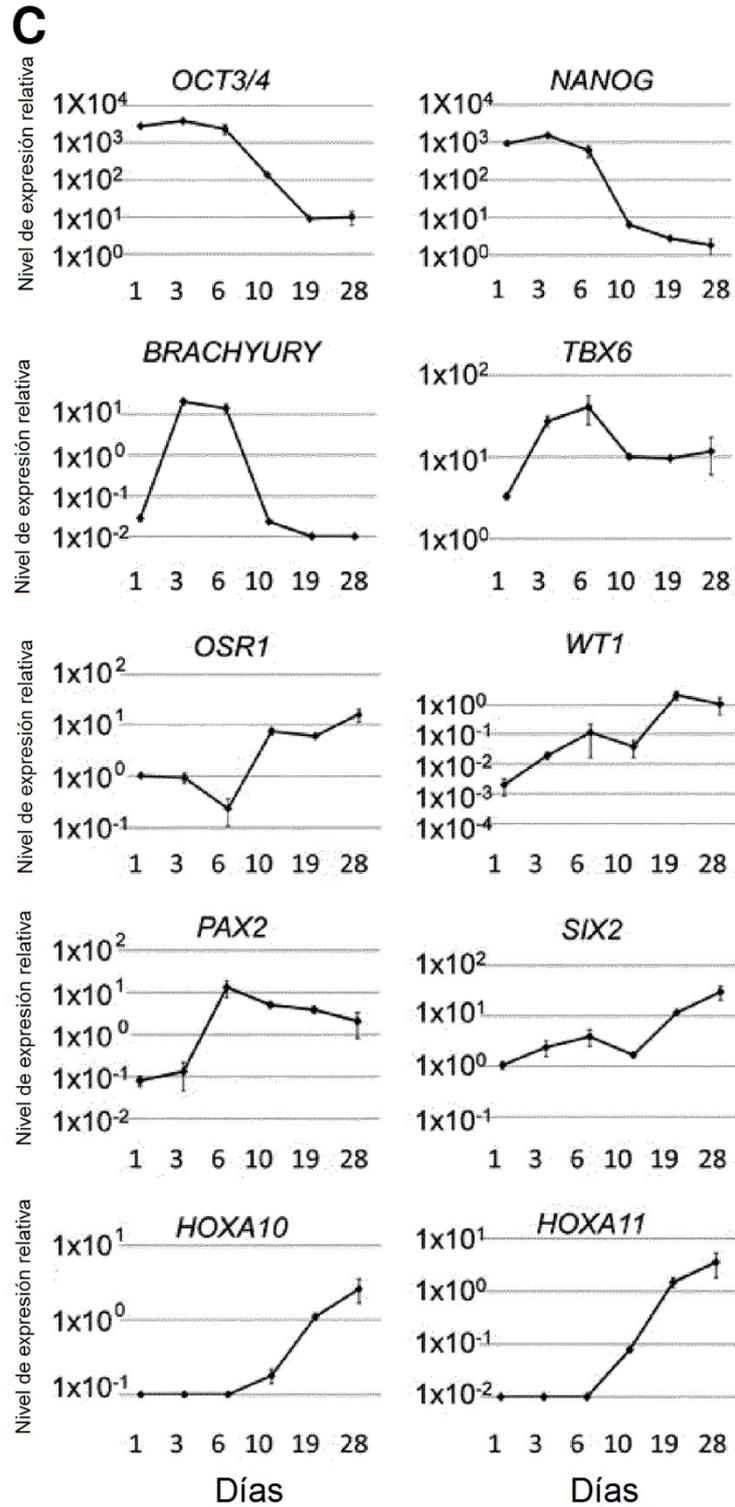


Fig. 3 (Continuación)

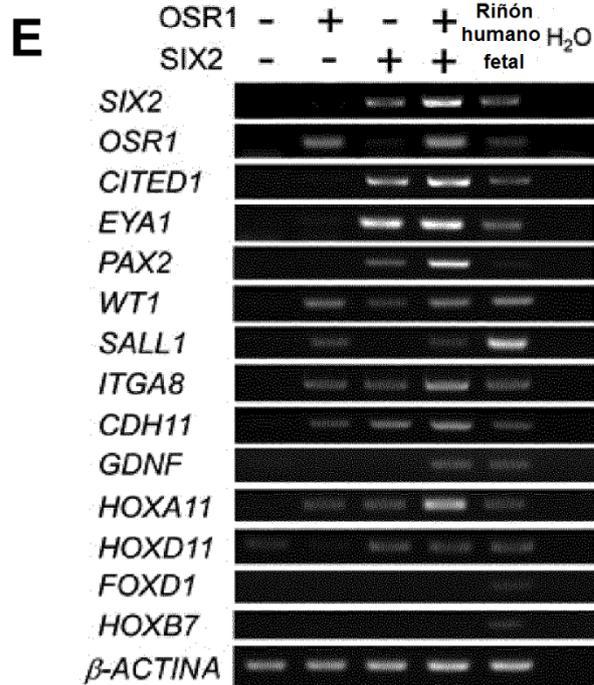
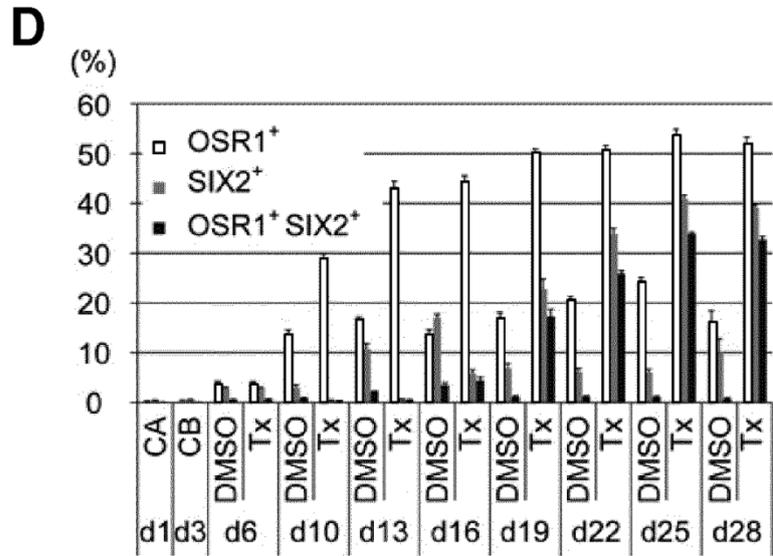


Fig. 4

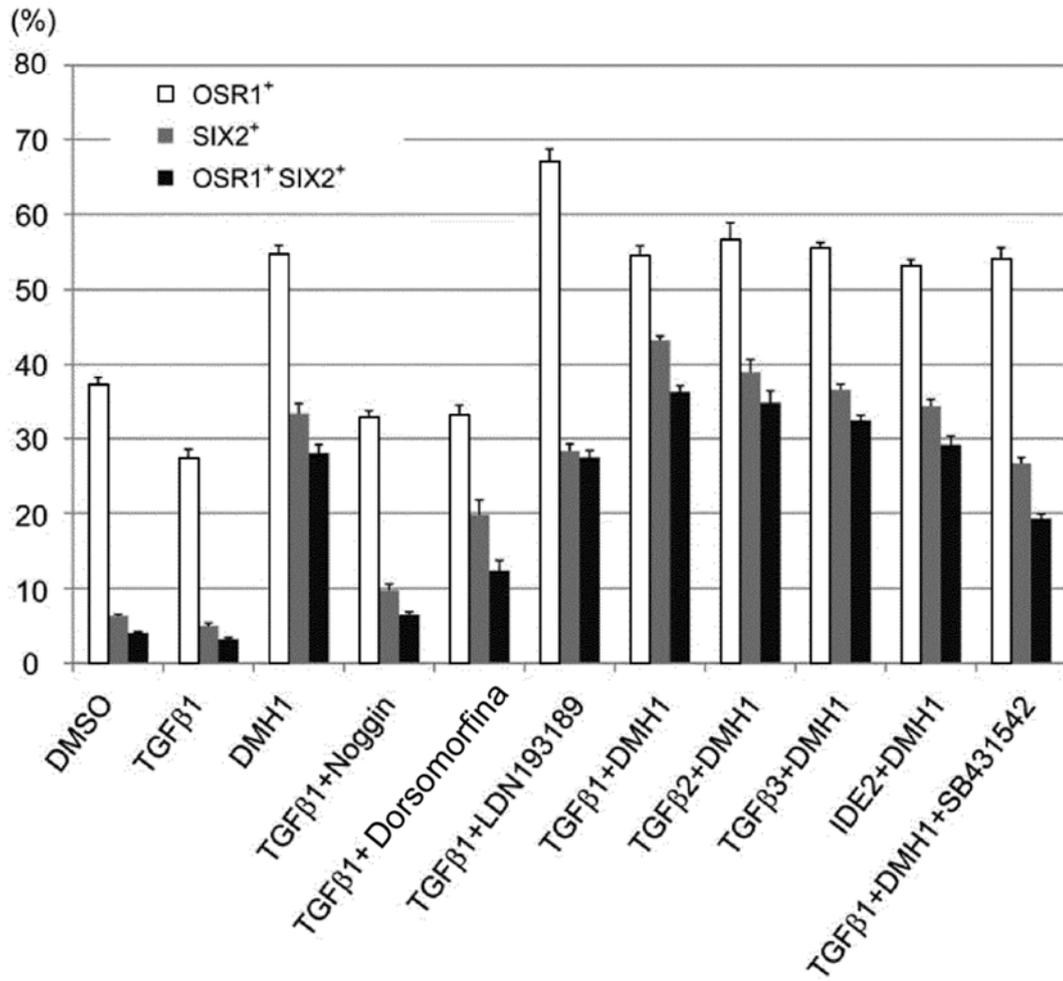


Fig. 5

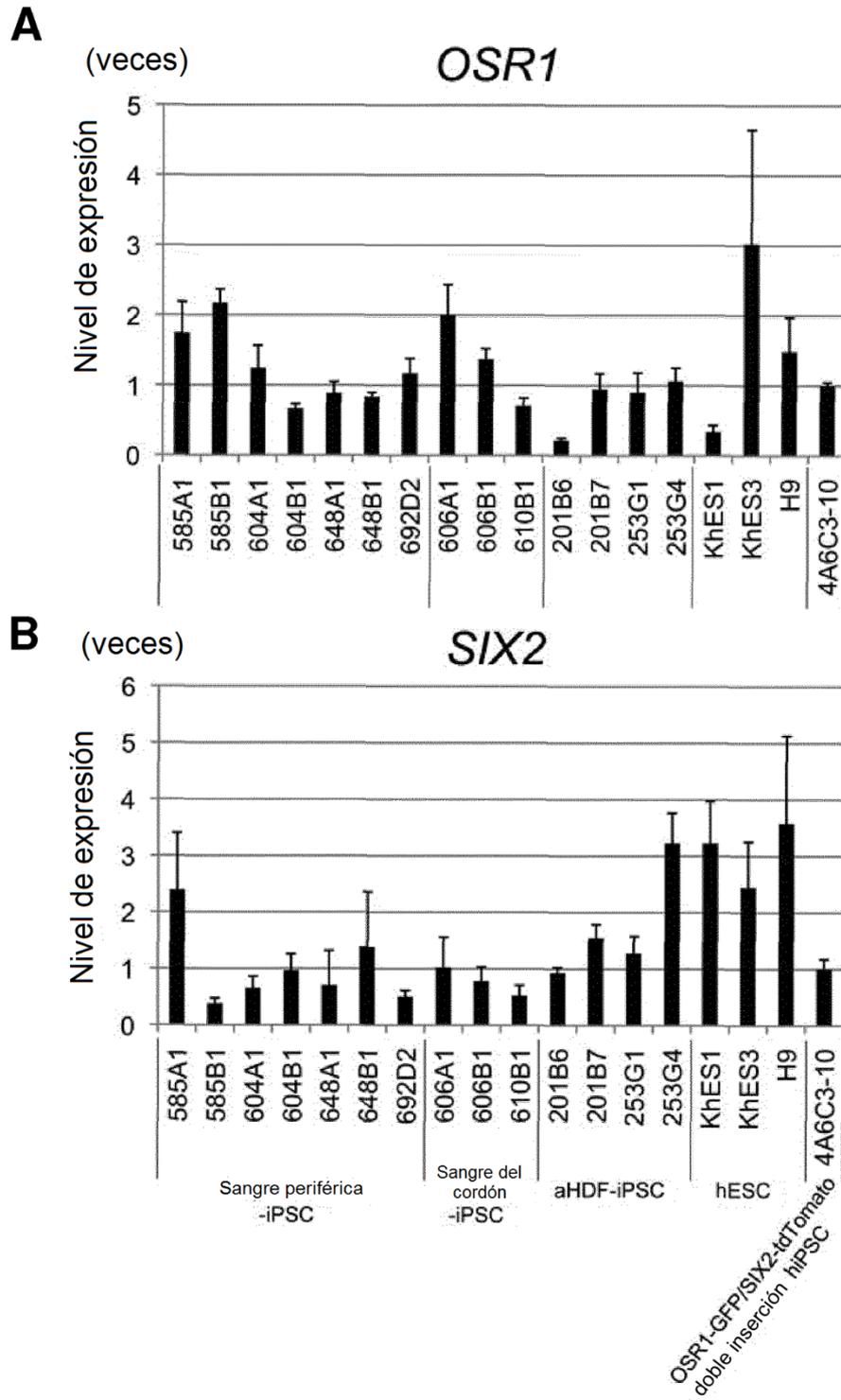


Fig. 6

A

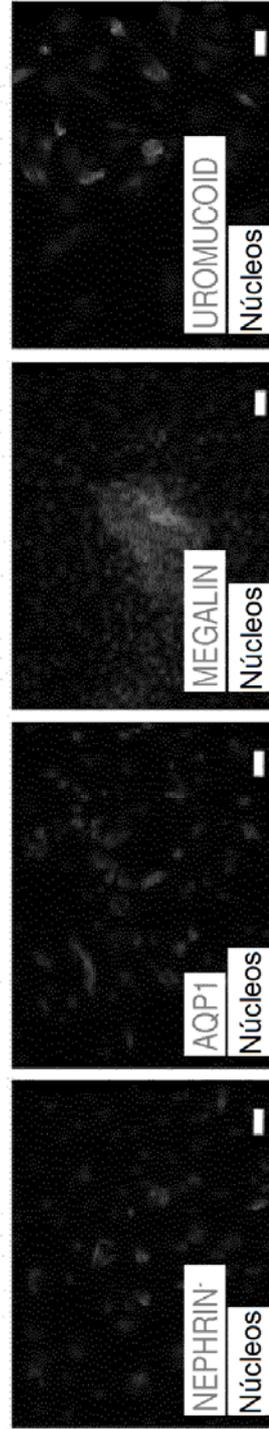


Fig. 6 (Continuación)

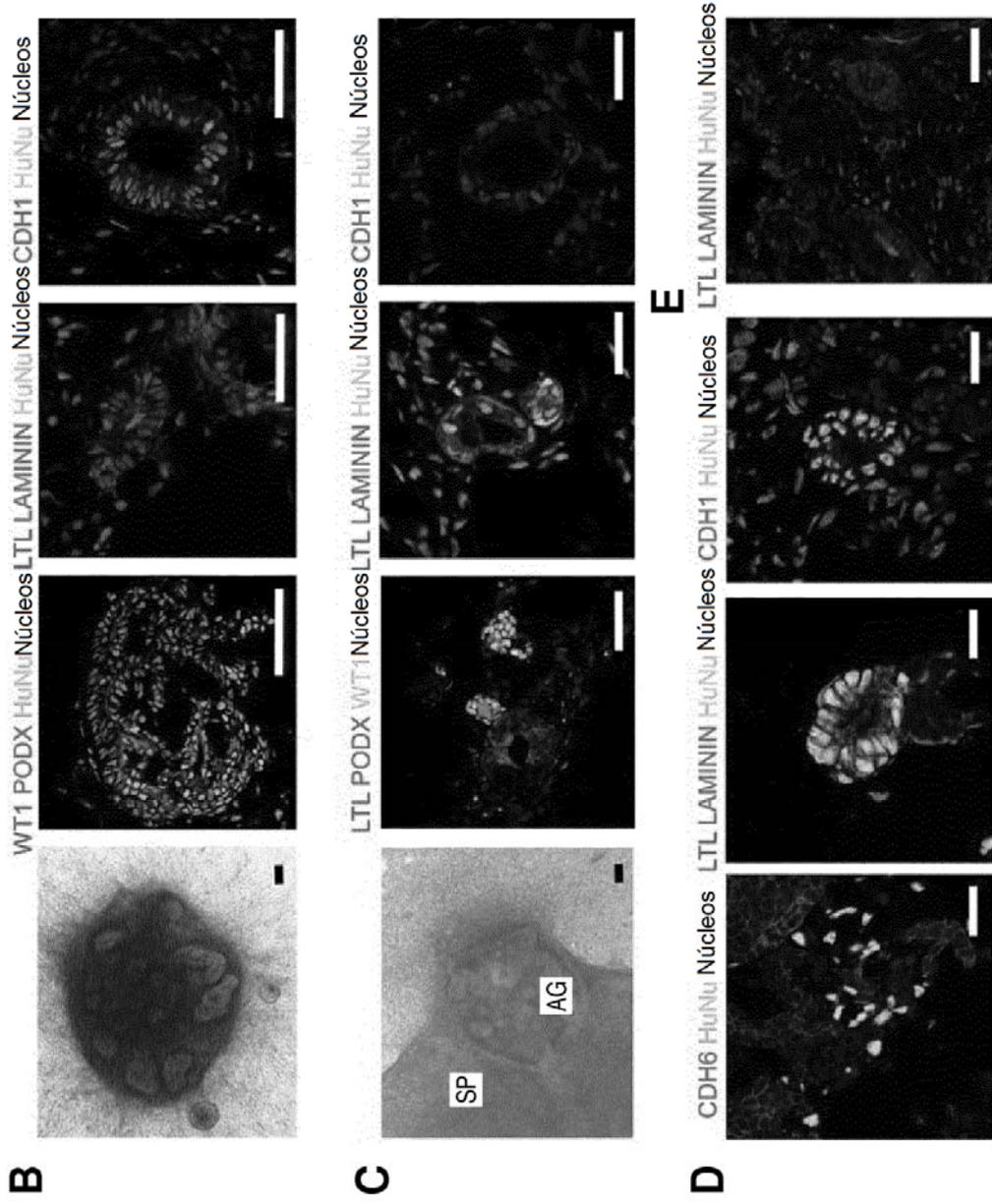


Fig. 6 (Continuación)

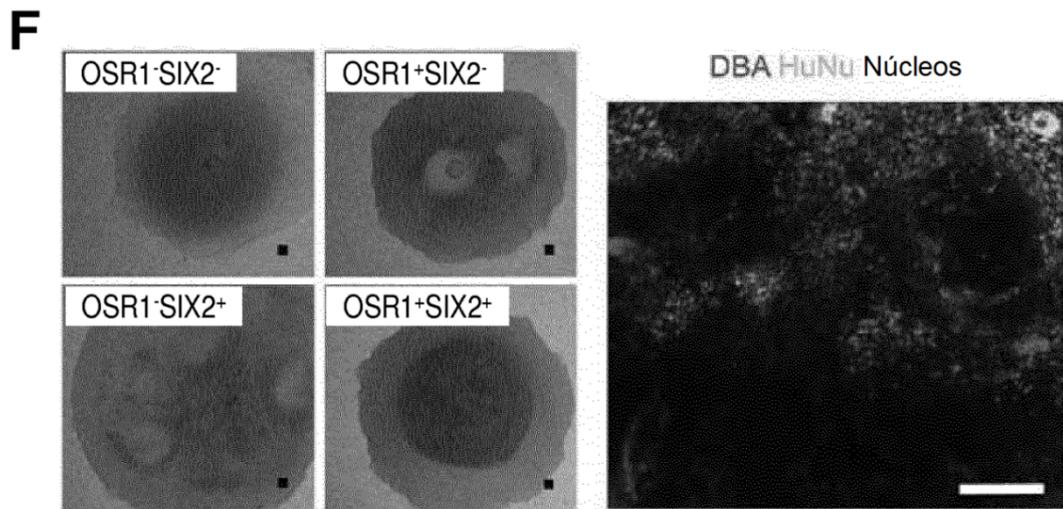


Fig. 7

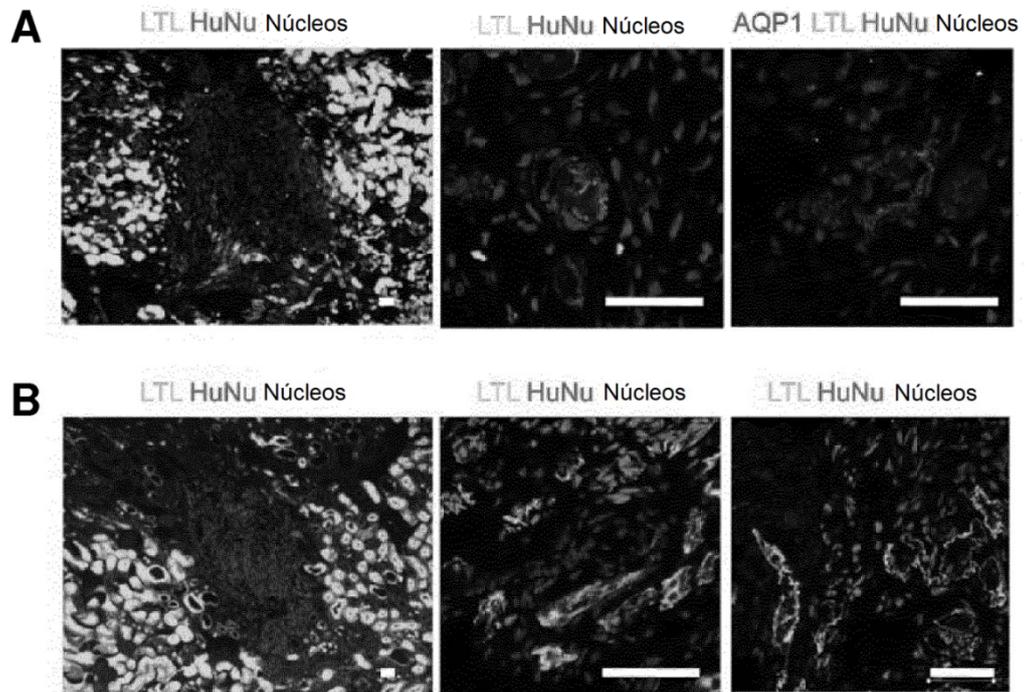


Fig. 7 (Continuación)

